



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

“QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C REACTIVA EM CÃES TRAUMATIZADOS E SUA  
IMPORTÂNCIA NA UNIDADE DE CUIDADOS INTENSIVOS – ESTUDO PRELIMINAR”

MARIA RAQUEL LAIRES FRAGA MORAIS DE PINA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Maria Constança Matias Ferreira

Pomba

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

Dr. Nuno Gonçalo Paixão Amaral dos

Santos Almeida

ORIENTADOR

Dr. Nuno Gonçalo Paixão Amaral dos

Santos Almeida

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Constança Matias Ferreira

Pomba

2010

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

“QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C REACTIVA EM CÃES TRAUMATIZADOS E SUA  
IMPORTÂNCIA NA UNIDADE DE CUIDADOS INTENSIVOS – ESTUDO PRELIMINAR”

MARIA RAQUEL LAIRES FRAGA MORAIS DE PINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba  
Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado  
Dr. Nuno Gonçalo Paixão Amaral dos  
Santos Almeida

ORIENTADOR

Dr. Nuno Gonçalo Paixão Amaral dos  
Santos Almeida

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

2010

LISBOA

---

## DECLARAÇÃO

Nome \_\_\_\_\_

Endereço electrónico \_\_\_\_\_ Telefone \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Número do Bilhete de Identidade \_\_\_\_\_

Título: Dissertação ☐ Tese ☐

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Orientador(es)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Ano de conclusão \_\_\_\_\_

Designação do Mestrado ou do ramo de conhecimento do Doutoramento

\_\_\_\_\_

Nos exemplares das teses de doutoramento ou dissertações de mestrado entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito legal na Biblioteca Nacional e pelo menos outro para a Biblioteca da FMV/UTL deve constar uma das seguintes declarações:

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ao meu avô...

Esta foi a forma que encontrei para te  
agradecer pelo enorme entusiasmo,  
orgulho, e alguma ansiedade com que tu  
próprio viveste a minha vida académica...

Muito Obrigado por Tudo AVÔ!



## **AGRADECIMENTOS**

Embora a Dissertação de Mestrado seja um trabalho individual, foi rodeada de amigos, colegas e familiares que a escrevi e concluí... Foi com eles que desabafei, ri, chorei, desesperei, voltei a rir... Seria uma enorme falha esquecer-me de cada pecinha encaixada por cada um deles, o que me permitiu montar este “puzzle”...

Um ano... aprender a um ritmo alucinante...ganhar confiança...sentir bons motivos para sonhar... criar asas...e voar...

Dr. Nuno, muito obrigado pela formação...dedicação...entusiasmo e confiança. Obrigado pelos “puxões de orelha” que só me fizeram lutar, CRESCER e vencer!

Professora Constança, obrigado por ter aceite o título de minha co-orientadora.Obrigado por ter estado ao meu lado em cada momento de “última hora” e de aflição, obrigado pela confiança que depositou em mim desde o início...um Beijinho desta sua “desvairada”.

Susana, a técnica de Laboratório mais extraordinária que já conheci...Hoje uma amiga das grandes, na altura uma profissional entusiasta que me ensinou os procedimentos laboratoriais e ao meu lado do princípio ao fim (inclusive nas suas férias) permitiu que as concentrações da PCR fossem quantificadas...Bem-haja.

Hum... e se existem pessoas Importantes na Nossa VIDA, essas são dúvida os nossos PAIS. A eles devo tudo o que sou...Acompanharam cada passinho deste projecto e intervieram em cada decisão minha...Um obrigado do tamanho do mundo para VÓS. Papá, apesar de o teu mundo serem os números, sei que não deve ter sido nada fácil, obrigado por me teres ajudado com as correcções...

O meu obrigado ao Professor David. Com Ele a estatística não se ficou pela média.

O meu obrigado à Professora Teresa Azevedo. Com Ela foi possível ter todos os pontos nos is e as vírgulas no seu lugar.

O meu obrigado ao meu amigo Frederico. As suas ilustrações deram vida e valorizaram o trabalho.

O meu obrigado ao Hugo Lucas. A apresentação a ele muito fica a dever.

E para a Equipa de HVC “aquele” Obrigado... Se hoje sonho, também foi porque vocês me deram tudo para sonhar... Sabem que mais... “HIMPECÁVEL”! Vocês sabem o quanto aprendi! Amigos, colegas e companheiros estagiários... “We can”! Hugo e Marisa... “Forever & Ever”.

Piri...e eis que chegou a tua vez...advinha lá o que vem p’ra ti...”Se cuidas de mim...eu cuido de ti também”.

A todos o meu grande, grande e sincero Bem-haja.

“Asas servem para voar, para sonhar”





## **RESUMO**

Em Medicina Humana, as proteínas de fase aguda são utilizadas para verificar/avaliar a presença de inflamação/infecção, evolução de uma patologia, ou resposta a tratamento. A existência da Proteína C Reactiva canina (PCR-c) foi confirmada em 1984.

Este estudo teve como objectivo primordial a quantificação das concentrações séricas da PCR-c, em pacientes com história de trauma (n=12), admitidos na unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central, bem como a sua interpretação, tendo em conta as diferenças entre os níveis médios observados nestes pacientes e em pacientes saudáveis (Grupo Controlo, GC) (n=10). Procedeu-se à recolha de amostras de sangue de cada paciente incluído no Grupo de Estudo (GE), imediatamente após entrada no já referido Hospital ou imediatamente antes da cirurgia (T0), no decorrer da hospitalização (T1), e nos pacientes em que tal foi possível (n=8), durante o período de recuperação (T2). Nos animais pertencentes ao GC procedeu-se à recolha de uma única amostra. As concentrações da PCR-c foram quantificadas pelo método ELISA – técnica “sandwich” (“Phase<sup>TM</sup> Range Canine C-reactive Protein Assay – Tridelta Development Limited, Irlanda”). Pretendeu-se simultaneamente, com este estudo, relacionar os níveis séricos da PCR-c com a gravidade da lesão, reflectida na morbilidade/mortalidade do paciente em questão, tendo-se para tal estudado a correlação entre as concentrações máximas ( $\mu\text{g/ml}$ ) da PCR-c em 10 dos 12 pacientes do GE e o tempo decorrido até à sua recuperação (dias).

Concluiu-se que as concentrações da PCR-c estavam acima dos valores normais ( $<6 \mu\text{g/ml}$ ) em todos os pacientes com história de trauma. As concentrações em T0 ( $71,758 \pm 52,672 \mu\text{g/ml}$ ), mostraram-se significativamente elevadas quando comparadas às concentrações da PCR-c no GC ( $2,375 \pm 1,953 \mu\text{g/ml}$ ) ( $p < 0,001$ ). Não existiu um decréscimo nas concentrações médias da PCR-c no decurso do tratamento médico/cirúrgico. Existe uma fraca correlação entre os níveis máximos da PCR-c e o número de dias de recuperação ( $r = 0,0043$ ).

Palavras-chave: Proteína C Reactiva, cão, trauma, morbilidade, mortalidade.



## **ABSTRACT**

In human medicine, the acute phase proteins are used to verify/evaluate the presence of inflammation/infection evolution of a disease, or response to treatment. The existence of canine C-reactive Protein (CRP-c) was confirmed in 1984.

The main objective of this study was the quantification of serum concentrations of CRP-c in patients with a trauma history (n=12), admitted to the Intensive Care Unit of the Central Veterinary Hospital, as well as their interpretation, taking into account the differences between the average levels observed in these patients and in healthy patients (Control Group, CG) (n=10).

Blood samples were collected from each patient included in the study group (SG), immediately after entering the hospital cited or immediately before surgery (T0), during hospitalization (T1) and, when it was possible, (n= 8) during the recovery period (T2).

A single sample was collect in animals belonging to the CG. The CRP-c concentrations were quantified by ELISA method - Sandwich Tech

nique ("Phase<sup>TM</sup> Range "Canine C-Reactive Protein Assay - Tridel<sup>TM</sup> Development Limited, Irland").

At the same time, we also intended to correlate the CRP-c serum levels with the severity of the injury, reflected in the patient morbidity/mortality. To accomplish this, the correlation between the CRP-c maximum concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) in 10 of 12 patients from SG and the elapsed time until their recovery (in days) was studied.

Concentrations of CRP-c were above normal values ( $< 6 \mu\text{g/ml}$ ) in all patients with a history of trauma. The concentrations at T0 ( $71.758 \pm 52.672 \mu\text{g/ml}$ ) were significantly high then the concentrations of CRP-c in CG ( $2.375 \pm 1.953 \mu\text{g/ml}$ ) ( $p < 0,001$ ).

During the medical / surgical treatment there wasn't a decrease in the average concentrations of CRP-c. There is a poor correlation between the maximum levels of CRP-c and the number of days of recovery ( $r=0,0043$ ).

Keywords: C-reactive Protein, dog, trauma, morbidity, mortality.



## ÍNDICE GERAL

|  |      |
|--|------|
| Índice de Figuras.....   | viii |
| Índice de Tabelas.....   | ix   |
| Índice de Imagens.....   | x    |
| Índice de Gráficos.....  | xi   |
| Lista de Siglas/Acrónimos e Abreviaturas.....  | xii  |
| <br>   |      |
| 1. CAPÍTULO I - ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR .....   | 1    |
| 1.1 Hospital Veterinário Central .....   | 1    |
| 1.1.1 Distribuição da população por espécie animal.....  | 1    |
| 1.1.2 Áreas Clínicas .....   | 2    |
| 1.1.2.1 Medicina Profilática .....   | 2    |
| 1.1.2.1.1 Vacinação .....  | 3    |
| 1.1.2.2 Patologia Médica .....   | 3    |
| 1.1.2.3 Patologia Cirúrgica .....  | 5    |
| 1.1.3 Exames complementares de diagnóstico .....   | 5    |
| 1.1.3.1 Análises Clínicas .....  | 6    |
| 1.1.3.2 Imagiologia .....  | 6    |
| 1.1.3.3 Anatomohistopatologia .....  | 7    |
| 1.1.3.4 Microbiologia.....   | 7    |
| 1.2 Hospital Veterinário na Universidade Autónoma de Barcelona .....   | 7    |
| 2. CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO GERAL.....   | 9    |
| 2.1 História da Proteína C Reactiva.....   | 10   |
| 2.2 Classificação, estrutura e caracterização da Proteína C Reactiva .....   | 10   |
| 2.2.1 Lectinas .....   | 10   |
| 2.2.2 Pentraxinas .....  | 11   |
| 2.2.3 Proteína C Reactiva .....  | 11   |
| 2.3 Mecanismos envolvidos na síntese de Proteína C Reactiva .....  | 14   |
| 2.3.1 A Resposta de fase aguda.....  | 14   |
| 2.3.1.1 O importante papel dos macrófagos.....   | 19   |
| 2.3.1.2 A reacção sistémica de fase aguda .....  | 21   |
| 2.3.1.3 Citoquinas e a resposta de fase aguda .....  | 22   |
| 2.3.1.4 O final da resposta de fase aguda .....  | 23   |
| 2.3.2 As proteínas de fase aguda .....   | 24   |
| 2.3.2.1 O papel dos mediadores inflamatórios na síntese de proteínas de fase aguda .....                                       | 28   |
| 2.3.3 A Proteína C Reactiva.....   | 32   |
| 2.3.3.1 Síntese hepática da PCR .....  | 33   |
| 2.4 Mecanismos de acção da Proteína C Reactiva.....  | 35   |
| 2.4.1 Capacidade de se fixar a diversos ligandos .....   | 36   |
| 2.4.2 Activação do Sistema Complemento através da sua via clássica .....   | 37   |
| 2.4.3 Estimulação da fagocitose .....  | 39   |
| 2.4.4 Capacidade de defesa contra múltiplas infecções bacterianas .....  | 41   |
| 2.4.4.1 Efeito protector da PCR humana em ratos infectados por <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....                           | 41   |
| 2.4.4.2 Efeito protector da PCR humana em ratos infectados pelo serovar <i>typhimurium</i> da <i>Salmonella enterica</i> ..... | 44   |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 2.4.4.3   | Efeito anti-bacteriano da PCR humana ao nível do tracto respiratório superior.....                   | 44 |
| 2.4.5     | Estimulação da libertação de citocinas inflamatórias pelos monócitos .....                           | 45 |
| 2.4.6     | Supressão dos efeitos nocivos despoletados pelos mediadores inflamatórios .....                      | 46 |
| 2.4.7     | Inibição da quimiotaxia .....  | 48 |
| 2.4.8     | Inibição da agregação e estabilização das membranas plaquetárias .....                               | 49 |
| 2.4.9     | Estimulação da actividade procoagulante .....  | 50 |
| 2.4.10    | Acção anti-neoplásica .....  | 50 |
| 2.5       | Quantificação das concentrações da PCR .....   | 51 |
| 2.5.1     | Reacções cruzadas entre a PCR canina e a PCR humana .....  | 52 |
| 2.5.2     | Imunodifusão .....   | 53 |
| 2.5.3     | Electro-imuno-ensaio .....   | 53 |
| 2.5.4     | “Enzyme-Linked Immunoabsorbentassay” (ELISA) .....   | 54 |
| 2.5.5     | Imunoturbidimetria .....   | 54 |
| 2.5.6     | “Capillary Reversed Passive Latex Agglutination” (CRPLA).....  | 55 |
| 2.5.7     | Imunocromatografia .....   | 55 |
| 2.6       | Alterações biológicas da Proteína C Reactiva.....  | 56 |
| 2.6.1     | Níveis fisiológicos da PCR.....  | 56 |
| 2.6.2     | Alterações fisiológicas da PCR: idade, estilo de vida e factores ambientais .....                    | 56 |
| 2.6.2.1   | Idade.....   | 56 |
| 2.6.2.2   | Género.....  | 56 |
| 2.6.2.3   | Ritmo circadiano.....  | 57 |
| 2.6.2.4   | Gestação .....   | 57 |
| 2.6.2.5   | Factores ambientais .....  | 57 |
| 2.6.3     | Alterações patológicas da PCR .....  | 58 |
| 2.6.3.1   | PCR em pacientes com lesão/inflamação aguda da mucosa gástrica .....                                 | 59 |
| 2.6.3.2   | PCR em pacientes com infecções bacterianas, virais e parasitárias .....                              | 59 |
| 2.6.3.3   | PCR após cirurgia .....  | 61 |
| 2.6.3.4   | PCR em doenças neoplásicas .....   | 63 |
| 2.7       | Utilização da Proteína C Reactiva na prática clínica.....  | 64 |
| 2.7.1     | A utilidade da PCR no diagnóstico diferencial de piómetra e hiperplasia quística do endométrio ..... | 66 |
| 2.7.2     | A PCR como marcador inflamatório de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SRIS).....          | 66 |
| 2.7.3     | A utilidade da Proteína C Reactiva na diferenciação dos derrames cavitários.....                     | 67 |
| 3.        | CAPITULO III - TRABALHO EXPERIMENTAL.....  | 68 |
| 3.1       | Objectivos .....   | 68 |
| 3.2       | Materiais e Métodos .....  | 68 |
| 3.2.1     | Animais envolvidos no estudo .....   | 68 |
| 3.2.1.1   | Grupo Controlo (GC) .....  | 68 |
| 3.2.1.2   | Grupo de Estudo (GE).....  | 69 |
| 3.2.2     | Colheita de amostras .....   | 70 |
| 3.2.2.1   | Análises Hematológicas .....   | 70 |
| 3.2.2.2   | Quantificação das concentrações da Proteína C Reactiva canina (PCR-c).....                           | 70 |
| 3.2.2.2.1 | Técnica para quantificação das concentrações séricas da PCR-c .....                                  | 71 |
| 3.2.2.2.2 | Valores de referência .....  | 72 |
| 3.2.3     | Análise estatística .....  | 73 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.3     | Resultados.....   | 73  |
| 3.3.1   | Grupo Controlo (GC).....  | 74  |
| 3.3.2   | Grupo de Estudo (GE) .....  | 74  |
| 3.3.2.1 | Subgrupo I.....   | 74  |
| 3.3.2.2 | Subgrupo II.....  | 74  |
| 3.3.3   | Avaliação das diferenças observadas entre os valores médios da PCR no GC e no GE .....  | 75  |
| 3.3.4   | Estudo de correlação entre os níveis máximos da PCR de cada paciente incluído no GE e o número total de dias relativos à sua recuperação..... | 75  |
| 3.4     | Discussão .....   | 76  |
| 3.5     | Perspectivas futuras .....  | 79  |
| 3.6     | Conclusão.....  | 81  |
| 4.      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 82  |
| 5.      | ANEXOS .....  | 106 |
| 5.1     | Anexo i.....  | 106 |
| 5.2     | Anexo ii.....   | 108 |
| 5.3     | Anexo iii .....   | 110 |
| 5.4     | Anexo iv.....   | 115 |
| 5.5     | Anexo v.....  | 119 |
| 5.6     | Anexo vi.....   | 120 |

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Complexo PCR-fosfocolina..   | 12 |
| Figura 2. Modelo da interacção entre a PCR e a fracção C1q do complemento.   | 13 |
| Figura 3. Ponto isoeléctrico da PCR canina em gel de agarose   | 14 |
| Figura 4. Representação esquemática da resposta de fase aguda.   | 16 |
| Figura 5. Reconhecimento dos agentes patogénicos por diferentes componentes do sistema imunitário inato – sistema complemento e das cininas, macrófagos e mastócitos | 20 |
| Figura 6. As proteínas de fase aguda. Efeito da IL-1, da IL-6 e de TNF $\alpha$ a nível hepático   | 24 |
| Figura 7. Diferenças interespecíficas nas principais proteínas de fase aguda produzidas por mamíferos domésticos   | 25 |
| Figura 8. Características padrão de alterações de algumas proteínas de fase aguda, depois de um estímulo inflamatório  | 27 |
| Figura 9. Regulação hepática da síntese de proteínas de fase aguda por mediadores inflamatórios.   | 28 |
| Figura 10. Estímulos que promovem a libertação de IL-1 pelos macrófagos  | 30 |
| Figura 11. Estrutura do gene da PCR.   | 33 |
| Figura 12. Modelo esquemático da actividade a nível transcricional mediada, pelas citocinas no gene humano da PCR.   | 34 |
| Figura 13. Activação da via clássica do Sistema Complemento pela PCR   | 38 |
| Figura 14. Ligandos da PCR   | 41 |
| Figura 15. Possível mecanismo de acção da PCR na modulação da inflamação   | 48 |
| Figura 16. Representação esquemática da reacção antigénica cruzada entre anticorpos anti-PCR humana e PCR canina   | 53 |



## **ÍNDICE DE TABELAS**

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1. Distribuição da população por espécie animal.....  | 1   |
| Tabela 2. Áreas Clínicas.....  | 2   |
| Tabela 3. Medicina Profilática.....  | 2   |
| Tabela 4. Vacinação.....   | 3   |
| Tabela 5. Patologia Médica.....  | 4   |
| Tabela 6. Patologia Cirúrgica.....   | 5   |
| Tabela 7. Exames complementares de diagnóstico.....  | 6   |
| Tabela 8. Análises Clínicas.....   | 6   |
| Tabela 9. Imagiologia.....   | 7   |
| Tabela 10. Anatomohistopatologia.....  | 7   |
| Tabela 11. Microbiologia.....  | 7   |
| Tabela 12. Mediadores de inflamação.....   | 21  |
| Tabela 13. Efeitos da IL-1 no organismo.....   | 30  |
| Tabela 14. Efeitos de TNF $\alpha$ .....   | 31  |
| Tabela 15. Principais funções biológicas das citocinas IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ .....                                     | 32  |
| Tabela 16. Tabela resumo do estudo realizado por Yamamoto et al., 1993b.....   | 62  |
| Tabela 17. Identificação de cada animal incluído no Grupo Controlo.....  | 69  |
| Tabela 18. Identificação e estímulo iatrotópico de cada animal incluído no Grupo de Estudo ....                            | 69  |
| Tabela 19. Concentrações séricas da PCR-c nos pacientes incluídos no GC.....   | 74  |
| Tabela 20. Concentrações séricas da PCR-c nos pacientes incluídos no GE, pertencentes ao Subgrupo I.....                   | 74  |
| Tabela 21. Concentrações séricas da PCR-c nos pacientes incluídos no GE, pertencentes ao Subgrupo II.....                  | 75  |
| Tabela 22. Valores médios da PCR-c no GC e no GE.....  | 75  |
| Tabela 23. Concentrações séricas da PCR-c e o número de dias de recuperação referente aos pacientes incluídos no GE.....   | 76  |
| Tabela 24. Identificação, estímulo iatrotópico e problemas concomitantes de cada animal incluído no Subgrupo I do GE.....  | 106 |
| Tabela 25. Identificação, estímulo iatrotópico e problemas concomitantes de cada animal incluído no Subgrupo II do GE..... | 107 |
| Tabela 26. Perfil hematológico – Hemograma.....  | 108 |
| Tabela 27. Perfil hematológico – Leucograma e contagem total de plaquetas.....   | 108 |
| Tabela 28. Perfil bioquímico – Hepático e Renal.....   | 109 |

## ***ÍNDICE DE IMAGENS***

|  |    |
|--|----|
| Imagem 1. Casos Clínicos .....   | 4  |
| Imagem 2. Cirurgia Ortopédica.....   | 5  |
| Imagem 3. e Imagem 4. Punção da veia jugular e Punção da veia cefálica ..... | 71 |
| Imagem 5. Kit para a quantificação da Proteína C reactiva canina.....        | 72 |

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

|   |     |
|---|-----|
| Gráfico 1 Curva de Calibração (1) para cálculo da Concentrações da PCR canina, a partir de concentrações de PCR-c previamente conhecidas .....  | 72  |
| Gráfico 2. Curva de Calibração (2) para cálculo da Concentrações da PCR canina, a partir de concentrações de PCR-c previamente conhecidas ..... | 73  |
| Gráfico 3. Gráfico de extremos e quartis referente ao GC e ao GE (T0, T1 e T2).....   | 119 |

## **LISTA DE SIGLAS/ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS E SINAIS/SÍMBOLOS**

Á: Amstrong  
ACTH: Hormona Adrenocorticotropica  
Ag-Ac: antigénio-anticorpo  
APPs: “acute phase proteins” ou seja, proteínas de fase aguda  
C (C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9): Componentes do Sistema Complemento  
C/EBP: “CCAAT-enhancer-binding proteins”  
Ca<sup>2+</sup>: íão Cálcio  
COX-2: Ciclooxygenase-2  
CRPLA: “Capillary reversed passive latex agglutination”  
“DNA”: Ácido desoxirribonucleico  
ELISA: “ Enzyme-linked immunoabsorbent assay”  
Fcγ: “Fragment of IgG” ou seja, fragmento da IgG  
FcγR: “Receptors for the Fc portion of IgG” ou seja, receptor para o fragmento Fc da IgG  
FH: Factor H  
GC: Grupo Controlo  
GE: Grupo de Estudo  
HDL: Lipoproteína de alta densidade  
HVC: Hospital Veterinário Central  
IFN (α e γ): Interferão  
IL: Interleucina  
“ITAM”: “Immunoreceptor tyrosine-based activation motif”  
“ITIM”: “Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif”  
LDL: Lipopolissacáridos  
n: número  
Nf-κβ: Factor de transcrição nuclear κβ  
NK: “Natural Killer”  
NOS<sub>2</sub>: monóxido de azoto sintase  
PAF: Factor de activação de plaquetas  
PAS: (coloração) reacção ao ácido periódico de “Schiff” (corante)  
PCR: Proteína C Reactiva  
PCR-c: Proteína C Reactiva canina  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PMNs: Polimorfonucleares Neutrófilos  
“RNA”: Ácido Ribonucleico  
rPAF: receptor específico de PAF  
SDS-PAGE: “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”  
SRIS: Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica  
STAT3: “Signal transducer and activator of transcription 3”  
“TLR”: “receptor Toll-like”  
TNF: Factor de Necrose Tumoral

## 1. CAPÍTULO I - ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

“Seis meses de alegria, aprendizagem, companheirismo...novas experiências, novos colegas, novos amigos... profissionais fantásticos com os quais tive o privilégio de aprender e sonhar...” É assim que recordo os “seis meses oficiais” do meu Estágio Curricular.

### 1.1 Hospital Veterinário Central (HVC)

Nos primeiros cinco meses fiz parte da equipa do Hospital Veterinário Central e, aqui encontrei aquela que viria a ser a minha segunda casa. Repartida entre quatro serviços rotativos, integrei as equipas de Cirurgia, Anestesia, Medicina Interna e Cuidados Intensivos.

Após cada dia de estágio participei em acções de formação, apresentadas inicialmente pelo Dr. Nuno Paixão (Director Clínico do Hospital Veterinário Central e Orientador do meu Estágio) e algum tempo depois apresentadas por nós, estagiários. Nestas palestras discutimos casos clínicos, abordagens e atitudes a tomar perante situações de urgência, fisiopatologias, diagnósticos diferenciais, terapêuticas de suporte, médicas e cirúrgicas. Os resultados, esses foram excepcionais. O nosso interesse aumentava dia após dia, consolidámos muito do conhecimento que havíamos adquirido anteriormente e fizemos muito saber de experiência vivida. Não me querendo alargar muito, irei de seguida dar a conhecer, resumidamente, as diferentes actividades que surgiram, durante o meu Estágio Curricular, no Hospital Veterinário Central.

#### 1.1.1 Distribuição da população por espécie animal

A grande maioria dos animais que acorreram aos Serviços de Consulta Externa, Cirurgia ou de Urgência do Hospital Veterinário Central, foram cães e gatos. É também já significativo o número de espécies exóticas referenciadas. Em termos de actividade clínica, os canídeos compreenderam 68,0% da população animal sendo deste modo a espécie com a maior expressão em termos de casuística.

---

**Tabela 1. Distribuição da população por espécie animal**

| ESPÉCIE  | FA   | FR (%) |
|----------|------|--------|
| Canídeos | 3317 | 68     |
| Felídeos | 1513 | 31     |
| Exóticos | 47   | 1      |
| TOTAL    | 4877 | 100    |

FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa

---

### 1.1.2 Áreas Clínicas

Para maior facilidade e compreensão de leitura, as áreas clínicas serão, para efeitos teóricos, divididas em Medicina Profilática, Patologia Médica, Patologia Cirúrgica e uma categoria adicional para procedimentos que não se enquadrem perfeitamente nos grupos anteriores. As consultas de alta clínica para animais internados no Hospital foram também registadas para efeitos de contabilidade total.

Deste modo, a área que apresenta o maior valor absoluto e relativo de casuística é a Patologia Médica.

---

**Tabela 2. Áreas Clínicas**

| <b>ESPECIALIDADE</b>        | <b>FA</b>   | <b>FR (%)</b> |
|-----------------------------|-------------|---------------|
| <i>Medicina Profilática</i> | 1024        | 21            |
| <i>Patologia Médica</i>     | 2195        | 46            |
| <i>Patologia Cirúrgica</i>  | 566         | 12            |
| <i>Tratamentos gerais</i>   | 439         | 9             |
| <i>Altas Clínicas</i>       | 585         | 12            |
| <b>TOTAL</b>                | <b>4809</b> | <b>100</b>    |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

---

#### 1.1.2.1 Medicina Profilática

A Medicina Profilática possui grande relevância clínica, quer por salvaguardar a saúde individual dos pacientes, quer por diminuir a incidência de Patologias futuras.

O procedimento médico profilático com maior expressão foi a vacinação, seguido da desparasitação. É no entanto importante mencionar que são já bastante frequentes as práticas de identificação electrónica (colocação de chip) e consultas de esclarecimento aos proprietários, quer no âmbito de dar a conhecer boas práticas para cuidar dos animais, quer para esclarecer dúvidas e/ou prevenir comportamentos e patologias de risco.

A colocação de identificação electrónica é um acto já bastante frequente e ocorre normalmente em simultâneo com consultas de vacinação sendo desta forma colocado na mesma categoria. Quero, contudo evidenciar que nem todas as vacinações foram acompanhadas de aplicação de chip.

---

**Tabela 3. Medicina Profilática**

| <b>PROCEDIMENTO</b>                | <b>FA</b>   | <b>FR (%)</b> |
|------------------------------------|-------------|---------------|
| <i>Vacinação (com ou sem Chip)</i> | 773         | 75,5          |
| <i>Desparasitação</i>              | 217         | 21,2          |
| <i>Consulta de esclarecimento</i>  | 34          | 3,3           |
| <b>TOTAL</b>                       | <b>1024</b> | <b>100,0</b>  |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

---

### 1.1.2.1.1 Vacinação

Em termos de vacinação é seguido, sempre que possível, o seguinte protocolo vacinal:

Para canídeos:

1. Primovacinação às 6 semanas de idade, contra Esgana e Parvovirose;
2. Às 8 semanas, contra Esgana, Hepatite infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza e Leptospirose;
3. Reforço 21 a 28 dias depois;
4. Às 16 semanas, contra a Raiva;
5. Reforços anuais.

Para felídeos:

1. Primovacinação às 8 semanas contra Calicivírus, Rinotraqueíte e Panleucopénia felina;
2. Reforço 21 a 28 dias depois.
3. Reforços anuais.

O procedimento vacinal é imperativamente precedido de um exame físico completo, sendo abortado sempre que o perfil imunitário do animal apresentar alterações.

A perfeita saúde do paciente é um requisito obrigatório para que exista uma resposta imunitária eficiente à vacina a administrar e, deste modo, imunização contra o agente alvo.

Em cães, a vacina com maior expressão em termos práticos foi a pentavalente (Esgana, Hepatite Infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza, Leptospirose), embora a vacina contra a raiva tenha tido também uma relevância bastante grande (ainda para mais se considerarmos a sua presença sob a forma hexavalente e monovalente).

**Tabela 4. Vacinação**

| ESPÉCIE  | CATEGORIA    | IMUNIZAÇÃO                                      | FA  | FR (%) |
|----------|--------------|---|-----|--------|
| Canídeos | Hexavalente  | DHPPi+L+R                                       | 139 | 25,5   |
|          | Pentavalente | DHPPi+L   | 188 | 34,4   |
|          | Monovalente  | R   | 123 | 22,5   |
|          | Bivalente    | DP  | 96  | 17,6   |
| TOTAL    |              |   | 546 | 100    |
| Felídeos | Monovalente  | Leucose Felina                                  | 17  | 7,5    |
|          | Trivalente   | Panleucopénia,<br>Rinotraqueíte,<br>Calicivírus | 210 | 92,5   |
| TOTAL    |              |   | 227 | 100,0  |

FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa DHPPi: Esgana + Hepatite Infecciosa+ Parvovirose + Parainfluenza | L: Leptospirose| R: Raiva

### 1.1.2.2 Patologia Médica

Do mesmo modo que a secção anterior, a área de Patologia Médica será dividida por áreas de especialidade clínica para facilidade de processamento e leitura dos dados recolhidos. Os

dados apresentados referem-se a consultas de especialidade realizadas no HVC (por ordem decrescente de frequência absoluta) e aos diagnósticos realizados nessas mesmas consultas ou posterior internamento do paciente.

No que respeita às consultas externas no HVC, a área com maior relevância foi a Gastreenterologia (que para efeitos práticos de contabilização engloba a Estomatologia assim como a Odontologia).

Não surgindo isoladas, existem animais integrados em diferentes especialidades, de acordo com as patologias concomitantes que apresentavam.

### Imagem 1. Casos Clínicos



Da esquerda para a direita e começando em cima: Kiko (Hiperadrenocorticismismo e Hipotiroidismo); Maria (Calcinosis cutis – Hiperadrenocorticismismo); Fred (Megacolon); Frinkz (Hemorragia escleral); Basti (Hérnia diafragmática); Simão (Coriza); Edgar (Broncopneumonia); Amália (Tromboembolismo).

### Tabela 5. Patologia Médica

| ESPECIALIDADE                                     | FA   | FR (%) |
|---|------|--------|
| Gastreenterologia, Estomatologia e Odontologia    | 1692 | 34,7   |
| Dermatologia                                      | 829  | 17     |
| Ortopedia   | 337  | 6,9    |
| Urologia  | 312  | 6,4    |
| Cardiologia                                       | 254  | 5,2    |
| Oftalmologia                                      | 254  | 5,2    |
| Ginecologia, Andrologia, Reprodução e Obstetrícia | 224  | 4,6    |
| Neurologia  | 205  | 4,2    |
| Doenças Infecciosas e Parasitárias                | 205  | 4,2    |
| Endocrinologia                                    | 171  | 3,5    |
| Oncologia   | 141  | 2,9    |
| Pneumologia                                       | 112  | 2,3    |
| Patologia de Exóticos                             | 68   | 1,4    |
| Toxicologia                                       | 44   | 0,9    |
| Patologias musculares                             | 18   | 0,4    |
| Etologia  | 11   | 0,2    |
| TOTAL   | 4877 | 100,0  |

FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa



### 1.1.2.3 Patologia Cirúrgica

A área de cirurgia de pequenos animais é imensa e possui tanto de fascinante como de complexo.

Foram acompanhadas as cirurgias realizadas assim como os procedimentos pré-cirúrgicos e anestésicos, monitorização anestésica e pós-cirúrgica.

As cirurgias de urgência são aquelas que, devido ao seu carácter urgente ou não planeado foram realizadas sem marcação ou registo prévio.

A área clínica com maior casuística cirúrgica foi a área dos tecidos moles.

---

#### **Imagem 2. Cirurgia Ortopédica**



*Rex (Animal politraumatizado)*

---

#### **Tabela 6. Patologia Cirúrgica**

| <b>ESPECIALIDADE</b>             | <b>FA</b>  | <b>FR (%)</b> |
|----------------------------------|------------|---------------|
| <i>Tecidos moles</i>             | 214        | 37,80         |
| <i>Cirurgias de Urgência</i>     | 101        | 17,84         |
| <i>Pele e Plástica</i>           | 99         | 17,48         |
| <i>Procedimentos Anestésicos</i> | 63         | 11,13         |
| <i>Ortopedia</i>                 | 47         | 8,30          |
| <i>Odontologia</i>               | 30         | 5,30          |
| <i>Oftalmologia</i>              | 8          | 1,41          |
| <i>Neurocirurgia</i>             | 3          | 0,53          |
| <i>Exóticos</i>                  | 1          | 0,18          |
| <b>TOTAL</b>                     | <b>566</b> | <b>99,97</b>  |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

---

### 1.1.3 Exames complementares de diagnóstico

Os exames complementares de diagnóstico são uma ferramenta de grande utilidade no dia-a-dia do clínico veterinário. Permitem obter informações detalhadas sobre um amplo leque de parâmetros que adicionam informações ao perfil de anamnese e exame físico obtido durante a consulta, para que se estabeleça uma lista mais precisa de possíveis diagnósticos diferenciais. Do mesmo modo, auxiliam na confirmação de um diagnóstico definitivo.

É bastante variado o espectro de exames complementares que se podem realizar; para facilitar a análise estatística os exames complementares serão agrupados por área de diagnóstico complementar.

As análises clínicas foram os exames complementares mais requisitados, sendo que a imagiologia teve também um peso bastante relevante.

**Tabela 7. Exames complementares de diagnóstico**

| <b>EXAMES COMPLEMENTARES</b> | <b>FA</b>    | <b>FR (%)</b> |
|------------------------------|--------------|---------------|
| <i>Análises Clínicas</i>     | 9614         | 71,4          |
| <i>Imagiologia</i>           | 2860         | 21,2          |
| <i>Anatomohistopatologia</i> | 763          | 5,7           |
| <i>Electrocardiograma</i>    | 140          | 1,0           |
| <i>Microbiologia</i>         | 65           | 0,5           |
| <i>Endoscopia</i>            | 22           | 0,2           |
| <b>TOTAL</b>                 | <b>13464</b> | <b>100,0</b>  |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

#### **1.1.3.1 Análises Clínicas**

As análises laboratoriais hematológicas, bioquímicas e serológicas destacaram-se, não só pela sua grande frequência mas também pela sua importância na elaboração de diagnósticos definitivos. As bioquímicas sanguíneas foram as análises mais frequentemente requisitadas.

**Tabela 8. Análises Clínicas**

| <b>ANÁLISES CLÍNICAS</b>      | <b>FA</b>   | <b>FR (%)</b> |
|-------------------------------|-------------|---------------|
| <i>Bioquímicas Sanguíneas</i> | 7621        | 79,3          |
| <i>Hemograma</i>              | 1292        | 13,4          |
| <i>Sorologia</i>              | 546         | 5,7           |
| <i>Urianálise</i>             | 114         | 1,2           |
| <i>Provas de Coagulação</i>   | 21          | 0,2           |
| <i>Coprologia</i>             | 12          | 0,1           |
| <i>Alergologia</i>            | 8           | 0,1           |
| <b>TOTAL</b>                  | <b>9614</b> | <b>100</b>    |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

#### **1.1.3.2 Imagiologia**

Os exames imagiológicos são utilizados de modo rotineiro no hospital e revelam-se fundamentais numa grande percentagem dos diagnósticos definitivos efectuados.

A radiografia foi o exame imagiológico mais requisitado.

**Tabela 9. Imagiologia**

| <b>IMAGIOLOGIA</b>        | <b>FA</b>   | <b>FR (%)</b> |
|---------------------------|-------------|---------------|
| <i>Radiografia</i>        | 2595        | 90,7          |
| <i>Electrocardiograma</i> | 120         | 4,2           |
| <i>Ecografia</i>          | 115         | 4,0           |
| <i>Ecocardiografia</i>    | 30          | 1,1           |
| <b>TOTAL</b>              | <b>2860</b> | <b>100,0</b>  |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

### 1.1.3.3 Anatomohistopatologia

Os exames anatomohistopatológicos mais requisitados foram a citologia e a histopatologia.

**Tabela 10. Anatomohistopatologia**

| <b>ANATOMOHISTOPATOLGIA</b> | <b>FA</b>  | <b>FR (%)</b> |
|-----------------------------|------------|---------------|
| <i>Citologia</i>            | 622        | 81,5          |
| <i>Histopatologia</i>       | 137        | 18,0          |
| <i>Necrópsia</i>            | 4          | 0,5           |
| <b>TOTAL</b>                | <b>763</b> | <b>100,0</b>  |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa*

### 1.1.3.4 Microbiologia

Os exames microbiológicos permitem a identificação de agentes infecciosos bacterianos ou fúngicos, assim como testar a sua sensibilidade a antibióticos.

A cultura de dermatófitos por DTM correspondeu a 80,0% dos exames microbiológico.

**Tabela 11. Microbiologia**

| <b>MICROBIOLOGIA</b> | <b>FA</b> | <b>FR (%)</b> |
|----------------------|-----------|---------------|
| <i>DTM</i>           | 52        | 80,0          |
| <i>Antibiograma</i>  | 13        | 20,0          |
| <b>TOTAL</b>         | <b>65</b> | <b>100</b>    |

*FA: Frequência absoluta | FR: Frequência relativa | DTM: Meio de cultura para Dermatófitos*

## 1.2 Hospital Veterinário na Universidade Autónoma de Barcelona

“Chegou o mês de Junho e com ele aquele que seria o último dos meus seis meses de Estágio Curricular... malas às costas, medos, sonhos e uma vontade incrível de viver este mês... Barcelona aí vou eu!”

Nestas quatro semanas integrei os Serviços de Dermatologia, Imagem e Anestesia.

No serviço de Dermatologia assisti a consultas realizadas por Iván Ravera, Médico Veterinário e Residente e Luís Ferrer, professor catedrático da Universidade, Doutoramento em Medicina

Veterinária, diplomado pelo Colégio Europeu de Dermatologia, chefe do Serviço de Dermatologia deste hospital e reitor da Universidade Autónoma de Barcelona.

Em imagem assisti a exames radiográficos e ecográficos realizados por Yvonne Espada Gerlach, Doutorada em Medicina Veterinária e chefe do Serviço de Imagem. Acompanhei também os exames ecocardiográficos realizados por Xavier Roura López, Doutorado em Medicina Veterinária e Diplomado pelo Colégio Europeu de Medicina Interna de Pequenos Animais.

No Serviço de Anestesia acompanhei o trabalho realizado por Xavier Moll Sánchez, Médico Veterinário de Pequenos Animais.

Durante os fins-de-semana integrei a equipa da Unidade de Cuidados Intensivos, onde realizei serviços nocturnos e diurnos juntamente com os Internos do referido Hospital.

## 2. CAPITULO II – INTRODUÇÃO GERAL

A resposta de fase aguda, não é mais, do que a resposta desenvolvida pelo próprio organismo perante qualquer lesão tecidual de modo a restabelecer a homeostase. Tal resposta caracteriza-se por sinais inflamatórios sistémicos, resultantes de alterações endócrinas, hematológicas, imunológicas, metabólicas e neurológicas e por uma alteração nas concentrações de algumas proteínas sintetizadas pelo fígado, denominadas proteínas de fase aguda.

Em Medicina Humana, as proteínas de fase aguda são utilizadas como parâmetros de rotina para verificar a presença de inflamação ou infecção, a evolução de uma patologia ou resposta a um determinado tratamento (Pepys, 1981).

No Homem, a Proteína C Reactiva (PCR) é uma das proteínas de fase aguda cuja concentração, mensurável no soro de pacientes sujeitos a um estímulo inflamatório, pode aumentar para concentrações mil vezes superiores ou mais. Em grande parte este aumento, na sua concentração, traduz-se por um aumento da sua síntese a nível hepático (Black, 2005). A existência da Proteína C Reactiva canina (PCR-c) análoga à PCR humana foi confirmada em 1984 por Caspi e seus colaboradores (Caspi et al., 1984).

No entanto, encontra-se demonstrado que a antigenicidade da PCR-c difere da humana, tendo Yamamoto et al (1993a) verificado não ser possível utilizar testes comerciais humanos para a determinação desta Proteína.

Um diagnóstico precoce de infecção, seja ela pós-traumática, pós cirúrgica ou simplesmente causada por uma diminuição das defesas imunitárias é um dos factores mais importantes, que se relaciona, muitas das vezes directamente com a morbilidade e mortalidade de um paciente hospitalizado.

Existem diversos parâmetros utilizados para a detecção de infecções, sendo a contagem de leucócitos e a temperatura, as mais utilizadas em Medicina Veterinária. No entanto, as proteínas de fase aguda também podem ser utilizadas com o mesmo propósito, sendo a PCR o indicador mais estudado e mais fiável para a detecção de infecções nos cães (Eckerssall, 2006c), uma vez que a resposta desta é mais rápida do que os parâmetros anteriormente referidos.

Isto ocorre, não só devido ao seu aumento rápido e substancial depois de um estímulo inflamatório, como, devido ao curto tempo de semi – vida, as suas concentrações plasmáticas ou tecidulares diminuem rapidamente após o término desse mesmo estímulo (Chambers, Hutton, Dieppe & Witcher, 1991).

A PCR pode ser útil na avaliação da presença, extensão e gravidade de processos patológicos ou alterações do organismo, no diagnóstico diferencial, na verificação da eficácia de um tratamento (Matijatko et al., 2007), no diagnóstico de complicações, contribuindo para a sua prevenção e com propósitos de prognóstico, uma vez que a duração e magnitude da resposta reflecte a gravidade da doença (Peterson, Nielsen & Heegaard, 2004).

## **2.1 História da Proteína C Reactiva**

A Proteína C Reactiva foi descoberta em 1930, no laboratório Oswald Avery's, por William Tillet e Thomas Francis do Instituto Rockfeller, ao identificarem, no soro de pacientes infectados por *Streptococcus pneumoniae*, durante a fase aguda de inflamação, uma substância que fazia precipitar o polissacárido C presente na parede celular do referido antigénio (Tillet & Francis, 1930).

Foram, desde então, realizados diversos estudos que concluíram que esta mesma substância não era detectável em pacientes saudáveis, mas que atingia elevadas concentrações em pacientes com infecções ou lesões tecidulares (Pepys, 1981).

Verificou-se também que, aquando da recuperação a substância, tornava-se novamente indetectável (Marnell, Mold & Du Clos, 2005).

Foram Abernethy e Avery que caracterizaram esta substância como sendo de natureza proteica e demonstraram a necessidade da presença do ião cálcio para a sua reacção com o polissacárido C (Pepys, 1981 citado por Vergobbi, 1992). Surge, assim, a noção da PCR como uma proteína de inflamação. A designação concreta de Proteína C Reactiva surge pelo facto de esta proteína reagir especificamente com o polissacárido C.

Na década de 70, Volanakis e Kaplan (1971) identificaram um ligando específico para a PCR, a fosfocolina, integrada no ácido tecóico, constituinte da parede celular do pneumococo.

Embora a fosfocolina tenha sido o primeiro ligando a ser conhecido, diversos estudos, *a posteriori*, identificaram outros tipos de ligandos (Black, 2005).

## **2.2 Classificação, estrutura e caracterização da Proteína C Reactiva**

### **2.2.1 Lectinas**

As Lectinas são proteínas com capacidade de se ligarem a carboidratos, requerendo, para tal, a presença do ião cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Dado que os mesmos são os maiores componentes das paredes celulares bacterianas, conclui-se que estas proteínas interagem, muitas das vezes, com bactérias (Tizard, 2009).

Nos mamíferos, as lectinas são classificadas de acordo com a estrutura do local que permite o estabelecimento da ligação ao carboidrato (Tizard, 2009).

As lectinas do tipo C incluem as colectinas plasmáticas e as selectinas que se encontram na superfície das células endoteliais e leucócitos. Na molécula de colectina, cada domínio terminal tem uma função distinta: enquanto que o domínio C-terminal se liga ao respectivo carbohidrato, o domínio N-terminal interage com células e com componentes do sistema complemento, sendo este último domínio responsável pelo efeito biológico da referida proteína. É esta capacidade em reconhecer carbohidratos estranhos ao organismo, que faz com que as colectinas sejam consideradas parte do sistema de defesa inato do hospedeiro (Tizard, 2009).

Em 1996, a PCR foi considerada uma lectina de reconhecimento inato, não só com base na estrutura tridimensional típica de cada uma das suas 5 subunidades, mas também pelo seu potencial na participação da resposta inespecífica, bem como na sua contribuição para uma resposta imunitária específica precoce (Fearon & Locksley, 1996; Shrive et al., 1996).

### **2.2.2 Pentraxinas**

As pentraxinas, uma das famílias de proteínas plasmáticas, são constituídas por cinco subunidades idênticas e unidas por ligações não covalentes (Schwalbe, Dahlbäck, Coe & Nelsestuen, 1992). Estas proteínas plasmáticas caracterizam-se por uma estrutura cíclica e pentamérica, uma sequência homóloga e a capacidade de estabelecerem ligações com outras moléculas na presença do  $\text{Ca}^{2+}$ . Os principais representantes desta família são a Proteína C Reactiva e o componente amiloide P sérico (Du Clos, 1996).

### **2.2.3 Proteína C Reactiva**

A Proteína C Reactiva é uma proteína de cadeia curta, constituída por cinco subunidades polipeptídicas idênticas e unidas por ligações não covalentes que formam um anel simétrico em torno de um poro central, cujo diâmetro externo é de 102 Å e o interno de 30 Å (Bottazzi et al., 1997; Goodman et al., 1996; Tsui et al., 1996; Volanakis, 2001).

Sendo apenas duas das cinco as subunidades glicosadas pôde-se observar, por electroforese em gel de poliacrilamida, a formação de duas bandas correspondentes aos dois tipos de subunidades, glicosadas e não glicosadas (Caspi et al., 1984).

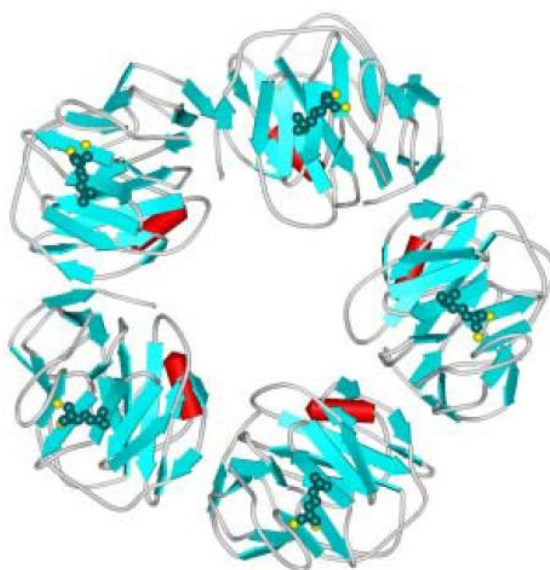
Cada subunidade, constituída por duzentos e seis aminoácidos, apresenta duas folhas  $\beta$  paralelas, observadas por cristalografia de Raio X, e uma hélice  $\alpha$ , encontrada sobre o rosto efector da proteína (Black, 2005; Shrive et al., 1996; Thompson, Pepys & Wood, 1999).

Na face plana de cada subunidade, encontra-se um receptor específico para a fosfocolina, constituído por dois locais com igual afinidade para o ião cálcio e um domínio hidrofóbico. Um dos  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se aos resíduos Asp<sup>60</sup>, Asn<sup>61</sup>, Glu<sup>138</sup>, Asp<sup>140</sup> e Gln<sup>139</sup>, enquanto que o segundo

ião interage com os resíduos Glu<sup>138</sup>, Asp<sup>140</sup>, Gln<sup>150</sup> e Glu<sup>147</sup>. Por sua vez, os íões cálcio ligam-se ao grupo fosfato da fosfocolina, e o grupo colina da mesma interage com a porção hidrofóbica do domínio constituído pelos resíduos Phe<sup>66</sup>, Leu<sup>64</sup>, Thr<sup>76</sup> e Glu<sup>81</sup>. Phe<sup>66</sup> e Glu<sup>81</sup> são provavelmente os dois mais importantes resíduos que medeiam a formação do complexo PCR-fosfocolina (Figura 1), tendo a sua importância sido demonstrada em múltiplos estudos. É a exposição do resíduo Phe<sup>66</sup> que permite o estabelecimento de interações hidrofóbicas com o grupo metil da fosfocolina, enquanto que Glu<sup>81</sup>, encontrado na extremidade oposta, interage com a carga positiva do nitrogénio do grupo colina (Agrawal, Simpson, Black, Carey & Samols, 2002; Black, Agrawal & Samols, 2003; Volanakis, 2001; Shrive et al., 1996; Thompson, Pepys & Wood, 1999). Agrawal e os seus colaboradores (2002) demonstraram, pela primeira vez, que a mutação destes resíduos impede a interacção da fosfocolina com a PCR (Agrawal et al., 2002). É ainda importante referir que a fosfocolina, componente da esfingomiélin e fosfatidilcolina, constituintes das membranas de células eucarióticas, apenas pode interagir com a PCR se, por necrose ou apoptose ocorrer destruição das mesmas membranas com o reaparecimento à superfície da fosfocolina (Agrawal et al., 2002; Black et al., 2003; Chang, Binder, Torzewski & Witztum, 2002; Du Clos, Zlock & Rubin, 1988; Gershov, Kim, Brot & Elkon, 2000; Hack et al., 1997; Lee, Takagahara & Lee, 2002; Oliveira, Gotschlich & Liu, 1980; Potempa, Siegel & Gewurz, 1981; Robey, Jones, Tanaka & Liu, 1984; Szalai, Agrawal, Greenhough & Volanakis, 1999; Volanakis & Wirtz, 1979).

---

**Figura 1. Complexo PCR-fosfocolina.** (Black, 2005).



---

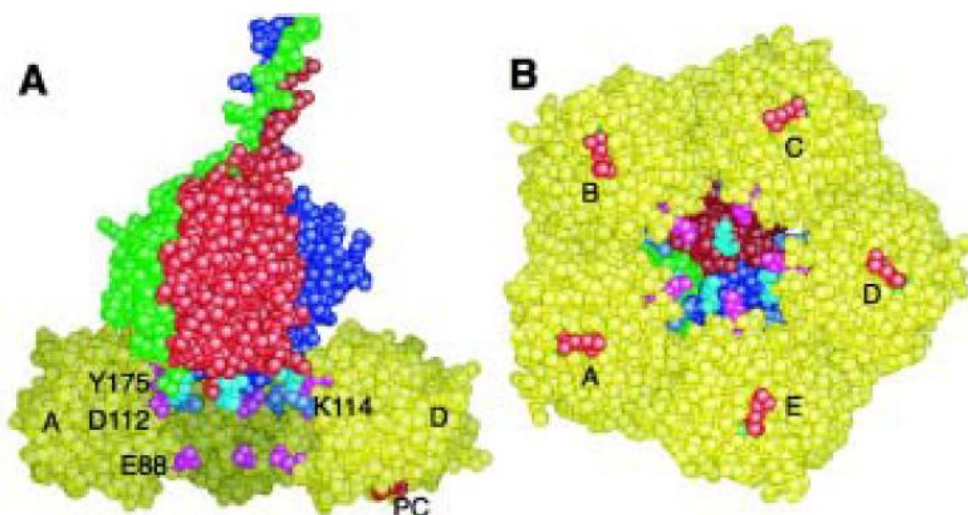
*Os íões cálcio são amarelos e as moléculas de fosfocolina vêm-se a verde.*

A face oposta do pentâmero, designada face efectora, constitui o local onde se liga a fracção C1q do complemento e onde provavelmente se liga FcγR. Esta face apresenta uma fenda que



se prolonga do centro de cada subunidade para o centro da molécula e onde se encontram vários resíduos, tais como Asp<sup>112</sup> e Tyr<sup>175</sup> (Agrawal, Shrive, Grennhough & Volanakis, 2001; Agrawal & Volanakis, 1994) que tornam possível a ligação da PCR a C1q (Black, 2005). Outros resíduos revelaram-se importantes na activação do complemento tais como Glu<sup>88</sup> e Lys<sup>114</sup>. De tal forma que a mutação de Glu<sup>88</sup>, apesar de não impossibilitar a ligação da PCR à fracção C1q conduziu a uma menor activação do sistema complemento, provavelmente explicada por uma ligeira alteração conformacional que se traduziu numa menor afinidade do receptor específico da PCR para C1q. Curiosamente a mutação de Lys<sup>114</sup> resultou numa maior activação do sistema complemento. Concluiu-se, assim, que a perda de uma carga positiva no local de ligação da PCR a C1q, favorece a interacção entre as duas moléculas. Também Asn<sup>158</sup> e His<sup>38</sup> se revelaram importantes, contribuindo para a correcta geometria do local de ligação. Em suma, neste modelo, existe complementaridade entre o domínio positivo da cabeça globular de C1q e o domínio negativo localizado no poro central do pentâmero, onde C1q interage com duas das cinco subunidades da PCR (Figura 2) (Agrawal et al., 2001).

**Figura 2. Modelo da interacção entre a PCR e a fracção C1q do complemento.** (Black, 2005).



*A: vista lateral da PCR | B: vista perpendicular da PCR. A, B, C, D e E correspondem às cinco subunidades da PCR. As subunidades de C1q encontram-se a verde, vermelho e azul (cores vivas).*

Quando se procurou caracterizar a Proteína C Reactiva, observou-se ao microscópio electrónico que esta apresenta uma configuração cíclica, plana, simétrica e pentamérica (cinco subunidades) (Eckersall & Conner, 1988 citado por Gillet, 2002; Caspi et al., 1984).

Já o seu peso molecular varia consoante o método utilizado na sua detecção, encontrando-se entre os 100 000 Dalton (Eckersall & Conner, 1988 citado por Gillet, 2002) e os 155 000 Dalton

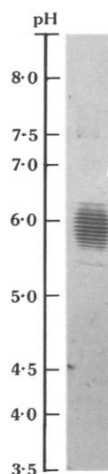
(Yamamoto et al., 1992 citado por Gillet, 2002), tendo, por isso, como valor médio 115 000 Dalton (Caspi et al., 1984).

A separação por SDS-PAGE, seguida de coloração PAS, demonstrou que as subunidades glicosadas, coradas, e não glicosadas, não coradas, apresentam um peso molecular de 25 000 e 22 000 Dalton respectivamente (Fujise et al., 1992).

O ponto isoeléctrico da PCR canina, determinado em gel de agarose, encontra-se compreendido entre pH 5,3 e pH 6,65 (Figura 3) (Caspi et al., 1984).

---

**Figura 3. Ponto isoeléctrico da PCR canina em gel de agarose. (Caspi et al., 1984).**



---

## 2.3 Mecanismos envolvidos na síntese de Proteína C Reactiva

### 2.3.1 A Resposta de fase aguda

O sistema imunitário é um conjunto coordenado de células e moléculas com grande capacidade para eliminar os agentes patogénicos, contudo nem sempre é necessário invocar todo o seu potencial. Muitas vezes, bastam as barreiras físicas (pele e mucosas), químicas (enzimas presentes em secreções, como a ptialina presente na saliva e a lisozima presente nas lágrimas, o pH do estômago ou o muco produzida pelas células epiteliais do tracto respiratório) e biológicas (microrganismos comensais) para se alcançar o resultado pretendido. No entanto, em certas ocasiões, e apesar da eficácia das referidas barreiras, a presença de feridas, de alterações da microbiota comensal, entre outras situações, permitem que microrganismos penetrem e atinjam zonas, normalmente assépticas, onde a sua presença induz uma infecção, originando o desencadear de uma resposta imunitária que se destina à sua eliminação (Larrea & González, 2006).

Em primeiro lugar actuam os mecanismos de resposta inata, inespecíficos, activados imediatamente, 0 a 4 horas, após contacto com o agente agressor e que precedem uma resposta imunitária específica (Larrea & González, 2006).

A resposta tem início no local de lesão tecidual e/ou de invasão de microrganismos. A cascata inflamatória é iniciada geralmente por células mononucleares, que libertam um largo espectro de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, mediadores lipídicos, aminas vasoactivas, produtos do sistema complemento e da cascata de coagulação, proteases e monóxido de azoto (Olson, Hellyer & Dodam, 1995; Hirvonen, 2000).

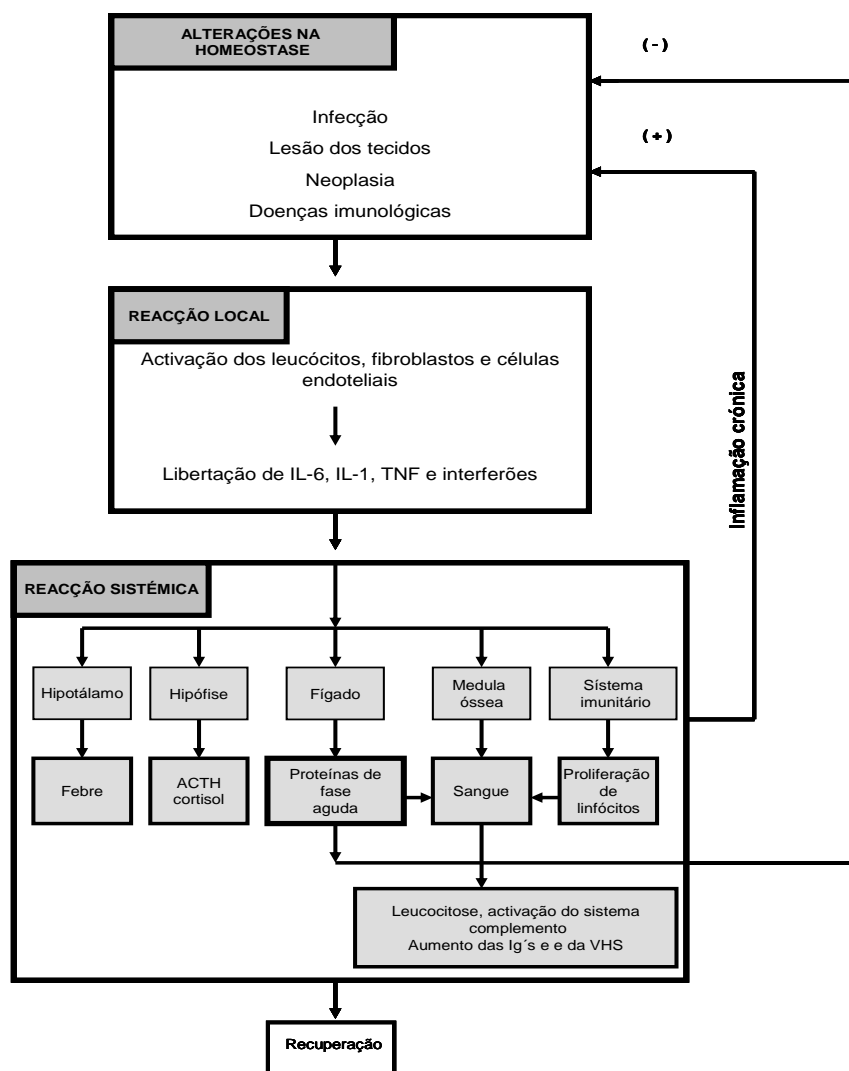
Os mediadores inflamatórios, por sua vez, são responsáveis pelo início, quer das reacções inflamatórias locais, quer das reacções sistémicas. As reacções inflamatórias locais caracterizam-se por vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, infiltração de leucócitos e pela activação local de granulócitos e macrófagos (Heinrich, Castell & Andus, 1990). O aumento da permeabilidade vascular permite o transporte de diferentes moléculas da corrente sanguínea para a área de lesão tecidual (Gruys, Toussaint, Niewold & Koopmans, 2005; Hirvonen, 2000). A migração de leucócitos para o local de inflamação é regulada pela adesão dos mesmos às células endoteliais, através de receptores presentes em ambos os tipos de células e activados por mediadores inflamatórios. Após a adesão dos leucócitos ao endotélio, segue-se a sua diapedese e a chegada ao foco inflamatório mediada por um leque de variados factores quimiotácticos. Desta forma, conclui-se que as reacções inflamatórias locais influenciam a reacção sistémica (Figura 4).

É o conjunto de reacções inflamatórias locais e sistémicas que constituem a resposta de fase aguda (Larrea & González, 2006; Gordon & Koy, 1985; Gruys et al., 1999; Tizard, 2009).

O termo “resposta aguda” foi introduzido no ano de 1941, tendo sido caracterizado pela presença plasmática de Proteína C Reactiva e outras proteínas de fase aguda (Abernethy & Avery, 1941; MacLeod & Avery, 1941). Hoje em dia, a resposta de fase aguda é considerada um processo dinâmico que envolve alterações sistémicas e metabólicas providenciadas, desde logo, pelo sistema imunitário não específico perante a presença de um insulto que precede uma resposta imunitária específica (Saini & Webert, 1991; Suffredini, Fantuzzi, Badolato, Oppenheim & O’Grady, 1999).

As células fagocitárias, polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e macrófagos desempenham um papel chave na eliminação de agentes estranhos ao organismo e a sua função traduz-se pela fagocitose, pela acção de hidrolases lisossómicas e radicais de oxigénio. Dois dos radicais de oxigénio, anião superóxido ( $O_2^-$ ) e monóxido de azoto ( $NO^-$ ), conseguem converter-se em peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), descrito como o maior agente citotóxico (Paape & Capuco, 1997).

**Figura 4. Representação esquemática da resposta de fase aguda.** (Heinrich et al., 1990). Imagem adaptada.



VHS – Velocidade de Sedimentação eritrocitária

As citocinas, polipéptidos produzidas por diversas células, actuam ao nível de diferentes moléculas-alvo. A sua síntese é iniciada por outros mediadores inflamatórios que induzem um sinal de tradução conduzindo à transcrição dos seus genes e consequente produção das mesmas (Koj, 1996).

As citocinas pró-inflamatórias, especialmente  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6 e  $IFN\gamma$ , são essenciais para o início da resposta inflamatória sistêmica (Kushner, 1993; Baumann & Gauldie, 1994; Koj, 1996; Murtaugh, Baarsch, Zhou, Scamurra & Lin, 1996), uma vez que, a nível local, estas citocinas activam as células do estroma, fibroblastos e células endoteliais, que por sua vez dão início a uma segunda produção de citocinas responsáveis pelo início da resposta inflamatória sistêmica propriamente dita (Baumann & Gauldie, 1994).

A acção sistémica das citocinas resulta numa activação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, com um aumento da produção da ACTH pelo hipotálamo e consequente aumento da produção do cortisol pelo córtex da adrenal (Paape, Schultze, Desjardins & Miller, 1974; Boosman, Mutsaers & Dieleman, 1990). Está também descrito o acréscimo das concentrações plasmáticas de muitas outras hormonas. Estas incluem as catecolaminas adrenais, o glucagon, a insulina, a aldosterona, a vasopressina e a prolactina (Kushner, 1982; Dinarello, 1984; Mandrup-Poulsen, 1995). Outras, porém, decrescem, tais como a hormona do crescimento (Gruys et al., 1999), renina, tiroxina, bem como os esteróides sexuais. Sabe-se que um dos objectivos destas alterações endócrinas é a estimulação do metabolismo energético (Hirvonen, 2000).

As principais alterações metabólicas que ocorrem durante a resposta de fase aguda são o aumento do catabolismo proteico e a gluconeogénese. As proteínas musculares são catabolizadas e os aminoácidos obtidos utilizados, quer na síntese de novas proteínas pelo fígado (proteínas de fase aguda, imunoglobulinas e colagénio, necessário para a reparação tecidual), quer na obtenção de energia através da neoglucogénese. O catabolismo das proteínas musculares resulta num balanço azotado negativo e na perda de peso por parte do animal. Contudo, os rins, o fígado e os pulmões, são preservados deste estado catabólico pelo facto de constituírem os maiores componentes do sistema fagocitário, cuja actividade se encontra frequentemente aumentada durante a resposta de fase aguda (Jennings & Elia, 1996). Uma das mais importantes alterações metabólicas é um aumento colossal da síntese hepática de um grupo de proteínas plasmáticas, induzidas pelos níveis aumentados de IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  poucas horas após o início da infecção, e que se designam colectivamente por proteínas de fase aguda (Baumann & Gauldie, 1994; Eckersall & Conner, 1988; Gruys, Obwolo & Toussaint, 1994; Kindt, Goldsby & Osborn, 2007; Kushner, 1982; Pannen & Robotham, 1995; Raynes, 1994). Estas proteínas são sintetizadas com o objectivo de auxiliar o combate à infecção (Tizard, 2009).

Durante a resposta de fase aguda, ocorrem alterações nas concentrações plasmáticas de determinados cations (Kushner, 1982). As concentrações de zinco e ferro decrescem substancialmente, enquanto que a concentração de cobre pode aumentar (Lohuis, Verheijden, Burvenich & van Miert 1988; Hayes, 1994). Estas variações reflectem quer alterações nas ligações dos mesmos cations a proteínas plasmáticas, quer alterações nos mecanismos celulares de captação. Por sua vez, a leucopénia transitória que se pode observar durante esta fase reflecte quer um decréscimo de linfócitos em circulação (induzido pelo stress), quer a migração de PMNs para o foco inflamatório. Quando a reserva de PMNs se esgota, neutrófilos imaturos entram em circulação (neutrofilia com desvio à esquerda). A poucas horas deste

declínio de PMNs maduros, a granulopoiese medular reinicia-se, verificando-se uma neutrofilia 1-2 dias após o início de uma inflamação aguda (Cole, Roussel & Whitney, 1997; Hirvonen, 2000). A activação do sistema complemento é outro fenómeno que ocorre durante a resposta de fase aguda (Koj, 1996).

A resposta de fase aguda incluiu ainda muitas alterações neurológicas. A sonolência observada deve-se a uma depressão do sistema nervoso central. A dor na região inflamada é mediada através de aminas vasoactivas, como a bradicinina (Baumann & Gauldie, 1994).

Quanto às propriedades imunossupressivas observadas durante a resposta de fase aguda, destacam-se a hiporreactividade dos linfócitos, a diminuição da capacidade bactericida dos PMNs e um decréscimo na fagocitose mediada pelos macrófagos (Kohler & Prokop, 1978; Kushner, 1982). As citocinas desempenham um papel muito importante como imunomoduladores, no entanto, muitas das proteínas de fase aguda produzidas pelo fígado, assumem também esta função (James, 1990; Motoi et al., 1992; Sato, Suzuki & Okada, 1995). A nível clínico, os animais apresentam geralmente, durante esta resposta, febre, anorexia, prostração e perda de massa muscular com consequente perda de peso (Dinarelli, 1983; Dinarelli, 1989; Ingenbleek & Carpentier, 1985; Ingenbleek & Young, 1994; Kraft, Rutchi, Burkhardt & Cottier, 1992; Kushner, Gewurz & Benson, 1981; Langhans, 1996; Moshage, 1997; van Miert, 1995).

O aumento do catabolismo das gorduras e das proteínas ao nível do tecido adiposo e muscular, permite o aumento da temperatura corporal via hipotálamo (febre), induzindo o sono (produção de moléculas indutoras do sono) e a supressão do apetite (Larrea & González, 2006; Tizard, 2009). O catabolismo proteico disponibiliza aminoácidos o que permite, entre outras, um aumento da síntese de anticorpos. Em geral, a febre é benéfica para resolver a infecção, uma vez que não só favorece a resposta imune, pois estimula a maturação de células dendríticas, aumenta os linfócitos em circulação e promove a síntese de uma citocina chave, a IL-2, como também dificulta o crescimento de muitos microrganismos, cuja temperatura óptima é 37°C (Larrea & González, 2006; Tizard, 2009). A letargia associada à febre reduz as demandas de energia do animal e aumenta a eficiência dos mecanismos de defesa e reparação (Tizard, 2009). Outro efeito característico observado durante as infecções é a perda de apetite induzida por TNF $\alpha$  e IL-1 ao nível do cérebro, que tem como objectivo eliminar os nutrientes e, deste modo, dificultar o crescimento de microrganismos (Larrea & González, 2006) originando uma perda de peso e uma diminuição no crescimento corporal (Stephensen, 1999), também relacionados com o estado catabólico característico (Larrea & González, 2006; Tizard, 2009). A alteração do comportamento social em animais doentes é induzida pela IL-1 (Tizard, 2009).

Para além de alterações nas concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda, causadas, essencialmente, por uma modificação no metabolismo hepático, outras variações podem ser valorizadas a nível laboratorial, tais como, diminuição de LDL e HDL no plasma sanguíneo, um aumento do número de leucócitos no sangue (leucocitose e neutrofilia), um acréscimo na concentração sérica de ACTH e de glucocorticóides (hidrocortisona), activação do sistema complemento e do sistema de coagulação sanguínea e um decréscimo nos níveis séricos de cálcio, zinco, ferro, vitamina A e  $\alpha$ -tocoferol (Dinarelli, 1983; Dinarelli, 1989; Gruys et al., 1994).

Em situações normais, a homeostase é garantida através de mecanismos neuroendócrinos, hematopoiéticos e metabólicos. Qualquer situação que provoque um desvio em qualquer um dos referidos mecanismos compromete a saúde do animal, e o organismo responde através de modificações metabólicas e sistémicas, ou através de alterações localizadas, como as reacções inflamatórias. A resposta de fase aguda tem como objectivos evitar a progressão da lesão num determinado órgão, isolar e destruir o microrganismo invasor, remover moléculas e detritos, sendo benéfica para o organismo uma vez que a sua acção se direcciona sempre na remoção da causa e no restauro da homeostase (Dinarelli, 1984; Baumann & Gauldie, 1994; Gruys et al., 2005; Hirvonen, 2000; Moshage, 1997).

A resposta de fase aguda é parte de uma resposta imunitária inespecífica, à qual se segue uma resposta imunitária específica e selectiva (Hirvonen, 2000). Esta por sua vez inclui, o processamento e a apresentação dos antígenos, a proliferação das células T e das células B e a formação de anticorpos.

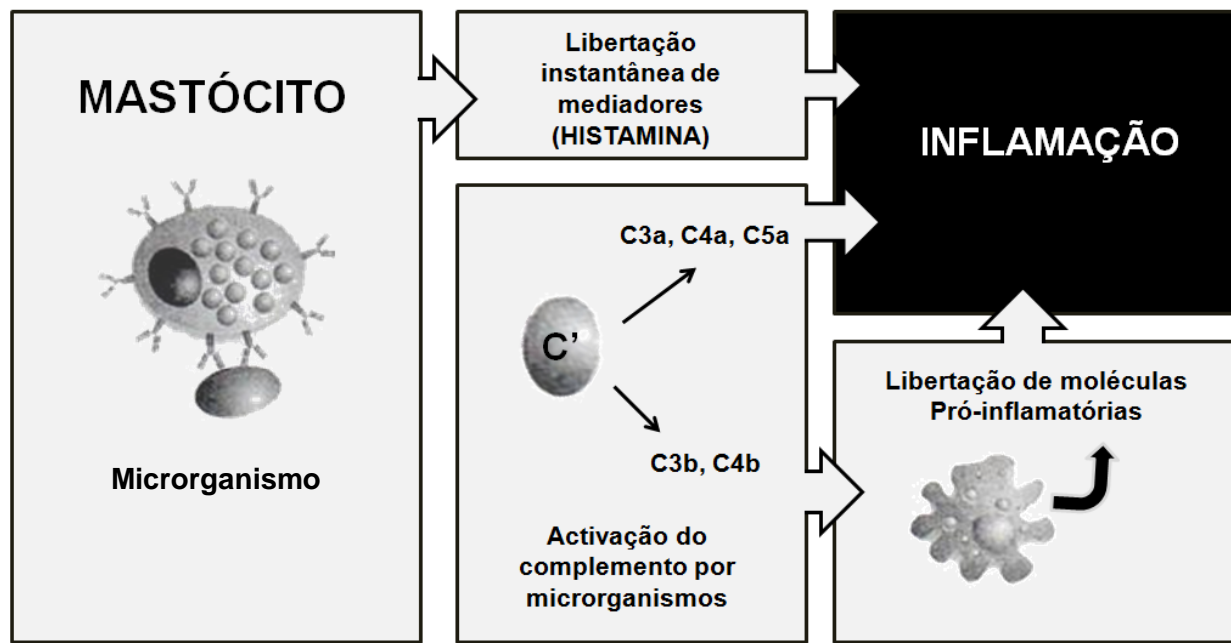
### **2.3.1.1 O importante papel dos macrófagos**

A nível local, os macrófagos, com origem em monócitos sanguíneos, fagocitam directamente os antígenos, uma vez que possuem receptores que reconhecem estruturas presentes em certos microrganismos, ou fazem-no indirectamente através da ligação a proteínas do complemento (principalmente C3b) ou à porção Fc das imunoglobulinas. Uma vez fagocitado, o agente patogénico pode ser imediatamente destruído pelos macrófagos, o que constituirá a resposta inata celular. Se tal não for possível, formar-se-á um foco infeccioso. Quando os macrófagos não conseguem destruir os agentes patogénicos, geram-se dois tipos de respostas que contribuem para a erradicação da infecção (Larrea & González, 2006).

A primeira traduz-se pela produção de citocinas – TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 e outros mediadores inflamatórios – prostaglandinas, leucotrienos, radicais de oxigénio, monóxido de azoto e peróxido de hidrogénio que induzem a inflamação. Estes mediadores (Tabela 12), juntamente com a activação do sistema complemento, as cininas e a

desgranulação dos mastócitos tecidulares (Figura 5), são responsáveis pela resposta inflamatória (Larrea & González, 2006).

**Figura 5. Reconhecimento dos agentes patogénicos por diferentes componentes do sistema imunitário inato – sistema complemento e das cininas, macrófagos e mastócitos.** (Larrea & González, 2006). Imagem adaptada.



A segunda resposta caracteriza-se pelo processamento e apresentação dos antígenos, bem como a indução da co-estimulação e consequente ativação de linfócitos T CD4, participando os macrófagos, desta forma, no desenvolvimento de uma resposta adaptativa ou específica, quando os primeiros mecanismos se demonstram ineficazes.

Os efeitos da resposta específica observam-se tardiamente, entre o segundo e quinto dia (Arosa, Cardoso & Pacheco, 2007) e garantem uma protecção duradoura, protegendo o hospedeiro de futuras infecções causadas pelo mesmo antígeno – células memória (Larrea & González, 2006).



**Tabela 12. Mediadores de inflamação. (Larrea & González, 2006). Tabela adaptada.**

| MEDIADORES DE INFLAMAÇÃO                             | ORIGEM  | EFEITOS   |
|--|---|---|
| Histamina  | Mastócitos e basófilos                            | Aumento da permeabilidade vascular<br>Contração do músculo liso<br>Quimioquinesis   |
| Serotonina   | Plaquetas   | Aumento da permeabilidade vascular<br>Contração do músculo liso   |
| Factor de activação das plaquetas (PAF)              | Basófilos, neutrófilos e macrófagos               | Libertação de mediadores plaquetários<br>Aumento da permeabilidade vascular<br>Contração do músculo liso<br>Activação de PMNs                           |
| Factor quimiotáctico de PMNs (NCF)                   | Mastócitos  | Quimiotaxia de PMNs   |
| IL-8 e outras quimioquinas                           | Monócitos<br>Macrófagos                           | Atração de PMNs e linfócitos  |
| C3a, C4a   | Complemento C3 e C4                               | Desgranulação dos mastócitos<br>Contração do músculo liso   |
| C5a  | Complemento C5                                    | Desgranulação dos mastócitos<br>Contração do músculo liso<br>Aumento da permeabilidade capilar<br>Quimiotaxia de PMNs e macrófagos<br>Activação de PMNs |
| Bradicinina  | Sistema das cininas (cininogénico)                | Vasodilatação<br>Dor<br>Contração do músculo liso<br>Aumento da permeabilidade vascular   |
| Fibrinopéptidos<br>Produtos da degradação da fibrina | Sistema de coagulação                             | Aumento da permeabilidade vascular<br>Quimiotaxia de PMNs e macrófagos  |
| Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )    | Via da cicloxigenase e Leucócitos                 | Vasodilatação que potencia a permeabilidade vascular induzida pela bradicinina e pela histamina   |
| Leucotrieno B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> )       | Via da lipoxigenase e Leucócitos.                 | Quimiotaxia de PMNs em sinergia com a PGE <sub>2</sub> , de modo a aumentar a permeabilidade vascular   |
| Leucotrieno D <sub>4</sub> (LTD <sub>4</sub> )       | Via da lipoxigenase e Leucócitos                  | Aumento da permeabilidade vascular<br>Contração do músculo liso   |
| Factor de necrose tumoral α (TNFα)                   | Macrófagos, células "Natural Killer" e mastócitos | Inflamação<br>Activação das células endoteliais.  |
| β quimioquinas                                       | Leucócitos  | Atração de monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos.  |

### 2.3.1.2 A reacção sistémica de fase aguda

A inflamação local é a maior reacção orgânica após lesão dos tecidos, causada pela infecção. A infecção, contudo, pode ocorrer sem inflamação. Por sua vez, a inflamação pode desenvolver-se devido a causas não infecciosas. No entanto, qualquer lesão tecidual conduz à libertação de citocinas pró-inflamatórias (van Miert, 1995). São estas citocinas, juntamente com os glucocorticoides e o monóxido de azoto que conduzem e modulam a resposta sistémica de fase aguda e conduzem à síntese hepática das proteínas de fase aguda (Gruys et al., 1994; Heinrich et al., 1990; Heinrich, Behrmann, Müller-Newen, Schaper & Graeve, 1998; van Miert, 1995).

Uma infecção bacteriana conduz geralmente a uma forte resposta sistémica de fase aguda (Alsemgeest, 1994; Alsemgeest et al., 1994), na sequência de uma forte reacção por parte das células mononucleares-fagocitárias. O TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são produzidos em consequência da presença de endotoxinas (Dinarello, 1983; Le & Vilcek, 1989; Monshouwer, Witkamp, Nijmeijer, van Amsterdam & van Miert 1996a; Monshouwer et al., 1996b; Schindler et al., 1990; Werling et al., 1996).

As infecções virais geralmente estão associadas a uma reacção de fase aguda moderada (Alsemgeest, 1994; Höfner, Fosbery, Eckersall & Donaldson, 1994; Kimura et al., 1995; Nakayama, Sonoda, Urano, Yamada & Okada, 1993).

As principais citocinas libertas por células infectadas são os IFNs, especialmente o IFN $\gamma$  por células mononucleares inflamatórias, embora o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , provenientes de células tecidulares, estarem também envolvidos. Na presença de uma destruição celular massiva podem ser observadas todas as proteínas de fase aguda (van Reeth, Nauwynck & Pensaert, 1998).

### **2.3.1.3 Citoquinas e a resposta de fase aguda**

Sintetizadas por leucócitos e outras células, as citocinas apresentam concentrações plasmáticas que aumentam em poucas horas após o estímulo inicial (Peterson et al., 2004). Estas estão envolvidas no desenvolvimento da resposta de fase aguda (Gruys et al., 2005), regulando e determinando a resposta imune, uma vez que promovem a sobrevivência, proliferação, diferenciação, activação ou morte das células (Kallio, 2000).

De acordo com a função que assumem as citocinas (polipéptidos de baixo peso molecular) estão divididas em três grupos: (1) citocinas que actuam como factores de crescimento (positivo ou negativo) para diversas células – IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 e factor de estimulação de granulócitos-macrófagos, (2) citocinas com propriedades pró-inflamatórias – TNF $\alpha$  e  $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IFN $\alpha$  e  $\gamma$ , IL-8 e proteína-1 inibidora de macrófagos e (3) factores com actividade anti-inflamatória – antagonistas dos receptores IL-1, receptores solúveis IL-1, proteína de ligação a TNF $\alpha$  e proteína de ligação a IL-1 (van Reeth et al., 1998).

As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela indução de febre e do catabolismo muscular anteriormente abordados, bem como pela activação de precursores dos glóbulos brancos e aumento do número de fibroblastos e macrófagos no local da lesão (Dinarello, 1983; Dinarello, 1989; Heinrich et al., 1990; Sehgal Grieninger & Tosato, 1988; van Miert, 1995). TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  são cruciais para a indução de outras citocinas (IL-6 e IL-8) e outros agentes como o factor de activação das plaquetas (PAF), prostaglandinas, leucotrienos e monóxido de azoto (van Miert, 1995).

Na resposta de fase aguda e a nível hepático TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 desempenham um papel chave, uma vez que, ao ligarem-se a receptores específicos nos hepatócitos, iniciam a síntese de várias proteínas de fase aguda (Heinrich et al., 1990; Heinrich et al., 1998; Le & Vilcek, 1989; Sehgal et al., 1988), actuando como mensageiros entre o local de lesão e os hepatócitos (Petersen et al., 2004). Além disso, o TNF $\alpha$  estimula o catabolismo muscular que é também mediado pelos glucocorticóides, bem como pela hiperglicémia induzida pelo glucagon o que permite um aumento da captação de aminoácidos pelo fígado. A IL-1 provoca um aumento no fluxo dos aminoácidos e a activação do sistema hipofisário-adrenal. Foi demonstrado que as células de Kupffer assumem um papel de intermediárias (Knolle et al., 1995), uma vez que após a estimulação por parte das citocinas pró-inflamatórias, estas células produzem e apresentam a IL-6 aos hepatócitos. A IL-6, por sua vez, minimiza a reacção em cascata uma vez que deprime a produção de IL-1 e TNF $\alpha$  pelos fagócitos mononucleares (Schindler et al., 1990). Uma diminuição da estimulação da resposta de fase aguda a nível hepático é alcançada quando as citocinas em circulação são removidas e aquando da libertação de IL-10 pelas células de Kupffer, o que resulta numa supressão da produção local de IL-6 (Knolle et al., 1995) e, consequentemente, numa diminuição da transcrição dos genes que codificam as proteínas de fase aguda (Heinrich et al., 1990; Heinrich et al., 1998). No fígado, parte da resposta de fase aguda é inibida pela IL-10 e IL-4 (Loyer et al., 1993).

Os glucocorticóides têm uma dupla função: (1) estimular os hepatócitos em sinergia com a IL-6 (Heinrich et al., 1990) e (2) diminuir a produção de citocinas pelos monócitos e macrófagos (Baybutt & Holsboer, 1990). A resposta de fase aguda resulta então destas complexas interacções. É importante referir que, embora sejam as citocinas que induzem a resposta de fase aguda, estas moléculas têm um tempo de semi-vida bastante curto, pelo que a sua medição não é geralmente utilizada com objectivo de diagnóstico, contrariamente às proteínas de fase aguda (Blackburn, 1994; Gruys et al., 1994; Gruys et al., 1999).

#### **2.3.1.4 O final da resposta de fase aguda**

O término da resposta de fase aguda envolve muitos mediadores inflamatórios, como os glucocorticóides, citocinas – IL-4 e IL-10, e antagonistas dos receptores de algumas citocinas pró-inflamatórias (Besedovsky, del Rey, Sorkin & Dinarello, 1986; Baumann & Gauldie, 1994; Koj, 1996). Após 24 a 48 horas do término do estímulo o organismo do hospedeiro retoma às suas funções normais. No entanto, a resposta de fase aguda pode-se prolongar no caso da inflamação aguda se tornar crónica (Baumann & Gauldie, 1994).

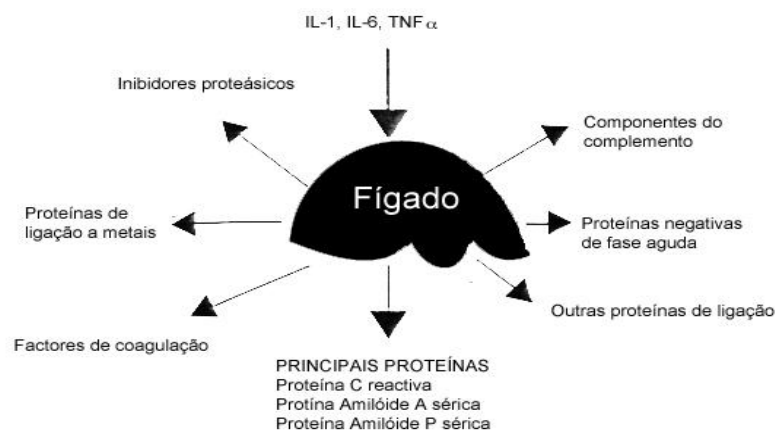
### 2.3.2 As proteínas de fase aguda

Foi durante os anos 20 e os anos 30 que investigadores descobriram alterações nas concentrações de proteínas plasmáticas durante a fase aguda da doença que precedia a recuperação ou a morte (Kindt et al., 2007) do paciente.

A poucas horas após o início da infecção, as concentrações das proteínas plasmáticas, designadas por reagentes de fase aguda ou proteínas de fase aguda (APPs), são rapidamente reajustadas. Estas alterações nas concentrações das proteínas plasmáticas, bem como um elevado número de alterações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas e nutricionais, tais como alterações neuroendócrinas, hematopoiéticas, metabólicas, hepáticas e nos constituintes plasmáticos não proteicos (Gabay & Kushner, 1999), protagonizam a resposta de fase aguda (Abbas, Lichtman & Pober, 1997). Predominantemente sintetizadas pelos hepatócitos no fígado, cuja produção é induzida por uma transcrição dos genes que as codificam em resposta a citocinas pró-inflamatórias – IL-6, IL-1 e TNF $\alpha$  (Figura 6), e mantendo concentrações constantes durante condições normais, estas proteínas assumem o papel principal na defesa do organismo após a invasão do mesmo por microrganismos. Assim, a sua quantificação permite avaliar a resposta inata do sistema imunitário a determinada alteração do organismo (Eckersall, 2006b citado por Archer, 2008).

---

**Figura 6. As proteínas de fase aguda. Efeito da IL-1, da IL-6 e de TNF $\alpha$  a nível hepático.** (Tizard, 2009). Imagem adaptada



---

Existem, contudo, diferenças substanciais interespecíficas na produção de APPs após a sua estimulação. Enquanto que a PCR é a principal proteína de fase aguda no homem, no cão e no porco, nos ruminantes as suas concentrações séricas são dificilmente modificadas pela presença de uma infecção ou inflamação. Nestas espécies, a haptoglobina é a principal proteína de fase aguda, cujos níveis negligenciáveis em animais saudáveis aumentam 100

vezes face à sua estimulação. Em contraste, no cão, no porco e no homem, a haptoglobina é uma proteína constitutiva e uma proteína moderada de fase aguda. Nos felinos a PCR não constitui um marcador ideal de inflamação, devendo-se utilizar no caso concreto dos gatos a  $\alpha$ -glicoproteína (Conner, Eckersall, Ferguson & Douglas, 1988a; Conner, Eckersall, Wiseman, Aitchison & Douglas, 1988b; Eckersall, 2006a; Eckersall, Saini & McComb, 1996) (Figura 7).

**Figura 7. Diferenças interespecíficas nas principais proteínas de fase aguda produzidas por mamíferos domésticos.** (Tizard, 2009).

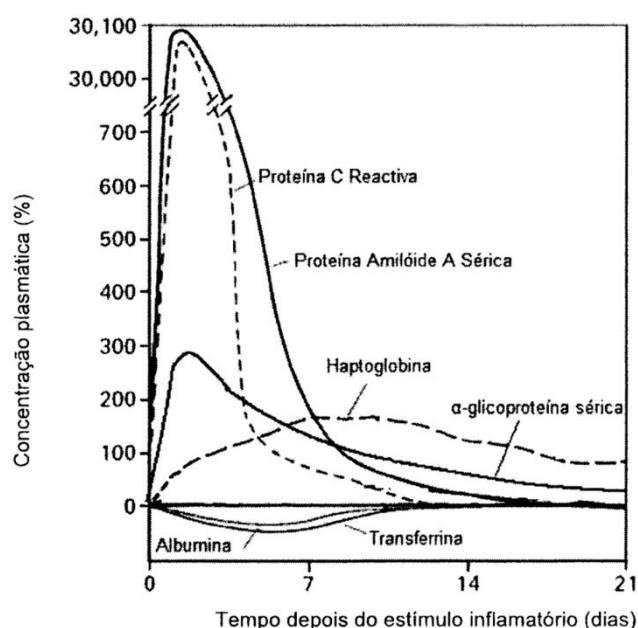


Algumas proteínas de fase aguda encontram-se continuamente em circulação, sendo por isso designadas por APPs constitutivas. Outras, porém, existem apenas durante a resposta de fase aguda, sendo por isso referidas como proteínas de fase aguda induzidas pela inflamação ou APPs induzidas pela resposta de fase aguda. Estas proteínas podem ainda ser classificadas de acordo com cinco critérios: (1) uma cinética de evolução rápida, (2) um aumento significativo da concentração plasmática, (3) uma variação independente da etiologia do processo inflamatório, (4) uma variação estrita da reacção inflamatória e (5) a possibilidade de

uma quantificação rápida e precisa (Gillet, 2002 citado por Archer, 2008). Está também descrito que as proteínas de fase aguda podem ser produzidas por outras células para além dos hepatócitos, tais como: monócitos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos (Mahon & Tice, 2006).

Muitas proteínas de fase aguda, como a Proteína C Reactiva e componentes do complemento, constituintes do sistema imunitário inato (Kindt et al., 2007), assim como a Proteína Amilóide A sérica e a Haptoglobina aumentam significativamente durante uma situação inflamatória sendo, por isso, designadas por APPs positivos (Heinrich et al, 1990) ou simplesmente APPs (Kushner, 1982). No cão, as proteínas de fase aguda positivas podem ainda ser divididas em três grupos, de acordo com o aumento da sua concentração aquando da reacção inflamatória. No primeiro grupo incluem-se a Proteína C reactiva e Proteína Amilóide A sérica (a principal proteína alternativa de fase aguda), cujas concentrações aumentam drástica e rapidamente em 4 horas (Gabay & Kushner, 1999; Kushner & Mackiewicz, 1987), atingindo valores 100 a 1000 vezes superiores aos seus valores normais. A sua produção é induzida pela IL-6 e TNF $\alpha$  e as suas concentrações máximas alcançadas entre as 24 e as 48 horas após o estímulo inicial, retomando rapidamente os valores normais - 48 horas após término do referido estímulo. A Proteína C Reactiva e Proteína Amilóide A sérica constituem o primeiro grupo de APPs a serem produzidas. A  $\alpha$ -glicoproteína sérica, pertencente ao segundo grupo, é uma proteína de fase aguda moderada, e que sofre um aumento de cerca de 5 a 10 vezes após o estímulo, atingindo um pico por volta do 2<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> dia. O seu retorno a valores normais é mais lento do que no caso das proteínas pertencentes ao primeiro grupo. Por último, o terceiro grupo, ao qual pertence a haptoglobina, caracteriza-se por apresentar um aumento da concentração de cerca de 2 vezes o valor normal (Eckersall, 2006b citado por Archer, 2008). Neste caso, a sua produção é primariamente induzida pela IL-6, e a sua normalização mais lenta em comparação ao primeiro grupo, podendo permanecer elevada por duas semanas (Gruys et al., 2005).

**Figura 8. Características padrão de alterações de algumas proteínas de fase aguda, depois de um estímulo inflamatório.** (Archer, 2008).



No caso de uma estimulação permanente, como acontece nas infecções crónicas, os níveis das proteínas de fase aguda permanecem elevados quando comparados aos valores normais, mas inferiores aos observados durante episódios agudos de inflamação ou infecção, podendo ser utilizados com objectivo de diagnóstico (Petersen et al, 2004). Estes níveis inferiores poderão dever-se a uma insuficiência na síntese de mediadores ou a uma incapacidade do fígado responder ao estímulo das citocinas de forma contínua e prolongada (Gillet, 2002).

O aumento da produção das APPs a nível hepático conduz a um decréscimo na produção de outras proteínas também sintetizadas pelo fígado, como a transtirretina, transferrina e albumina, designadas por APPs negativos (Gruys et al, 1994; Hayes, 1994; Heinrich et al, 1990; Jain, 1993; Mahon & Tice, 2006). No caso concreto da albumina, a diminuição da sua síntese justifica-se pela necessidade de uma grande quantidade de aminoácidos não compatível com as necessidades requeridas para a síntese de proteínas de fase aguda (Paltrinieri, 2007). Por outro lado, a síntese diminuída da transtirretina é justificada pela sua função, uma vez que esta inibe a produção de IL-1 pelos monócitos e macrófagos, não sendo, portanto, compatível a sua presença com a produção de proteínas de fase aguda (Gabay & Kushner, 1999) (Figura 8).

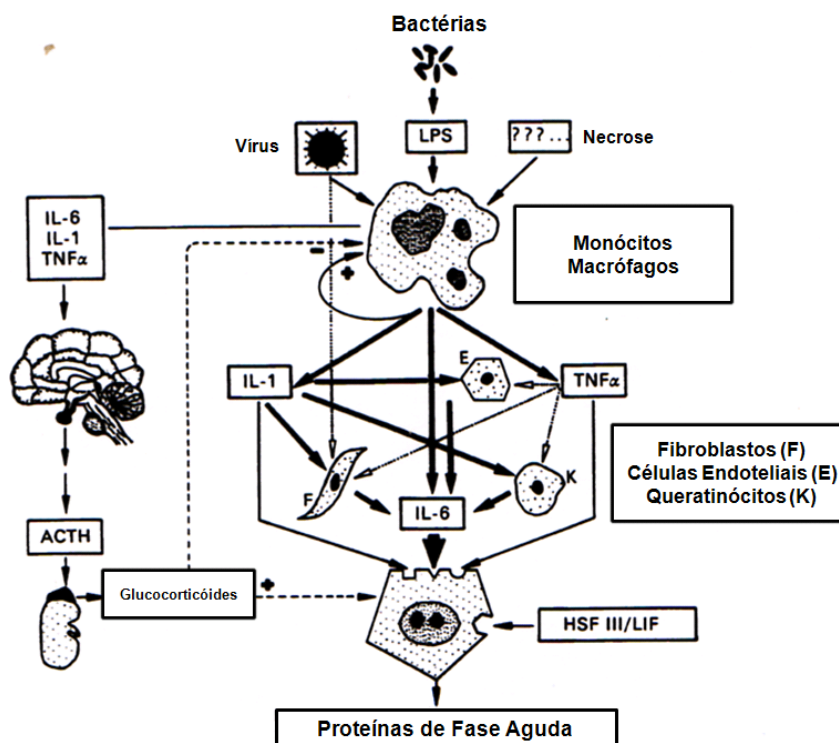
Uma vez em circulação, as funções das proteínas de fase aguda traduzem-se pela directa neutralização de agentes inflamatórios, pela diminuição das lesões a nível local, pela destruição dos microrganismos e pela cooperação na reparação e reconstituição dos tecidos,

após lesão tecidual, trauma ou infecção, participando assim nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Mahon & Tice, 2006).

### 2.3.2.1 O papel dos mediadores inflamatórios na síntese de proteínas de fase aguda

A síntese e a libertação de proteínas de fase aguda pelo fígado são reguladas por mediadores inflamatórios, factores solúveis produzidos ao nível do local de inflamação por células activadas. Para além das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  e TNF  $\alpha$  e  $\beta$  já referidas, estão também incluídos os glucocorticoides e factores de crescimento (Figura 9). Enquanto que as citocinas estimulam a expressão dos genes que codificam as proteínas de fase aguda, os glucocorticoides e os factores de crescimento modulam a actividade das mesmas citocinas (Baumann & Gauldie, 1994).

**Figura 9. Regulação hepática da síntese de proteínas de fase aguda por mediadores inflamatórios.** (Heinrich et al., 1990). Imagem adaptada.



Depois de entrarem em circulação, estes mediadores inflamatórios atingem o fígado, onde se ligam aos seus respectivos receptores nos hepatócitos, induzindo a expressão genómica das APPs (regulada a um nível transcricional) e a sua síntese (Kushner, 1993; Pannen & Robotham, 1995).



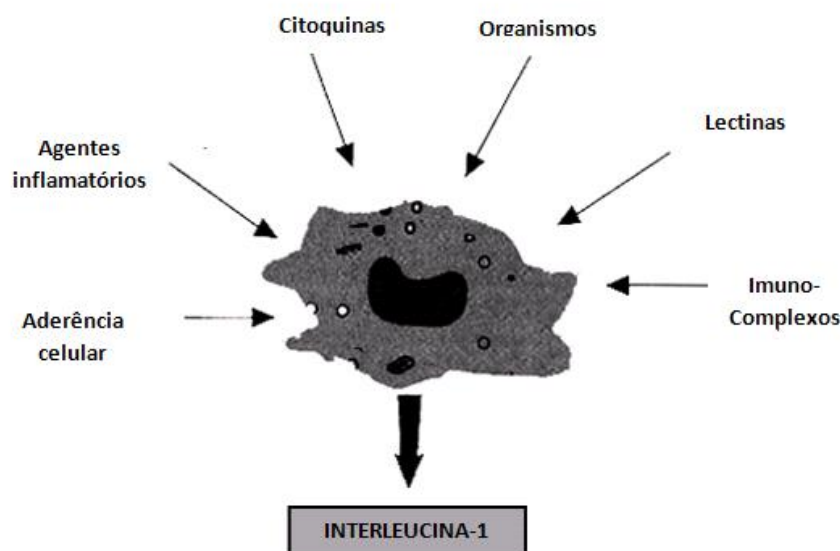
As citocinas pró-inflamatórias podem ser divididas em dois grupos de acordo com o modo como estimulam a produção das proteínas de fase aguda, (1) citocinas do tipo IL-1 (inclui a IL-1 e TNF $\alpha$ ) e (2) citocinas do tipo IL-6 (que inclui somente a IL-6), actuando através de diferentes receptores localizados na membrana dos hepatócitos (Mackiewicz, 1997; Suffredini et al., 1999). As citocinas do tipo IL-1 induzem o primeiro sinal estimulatório (Content et al., 1985; Dinarello et al., 1986; Nawroth et al., 1986a), conduzindo à produção de citocinas do tipo IL-6 por vários tipos de células (Mackiewicz, 1997). Por sua vez, estas últimas exercem um feed-back negativo na produção das citocinas do tipo IL-1 (Aderka, Le & Vilcek, 1989; Jordan et al., 1995; Mizuhara et al., 1994; Schindler et al., 1990). Enquanto o TNF $\alpha$  induz a proteólise periférica, o que permite um aumento do fluxo de aminoácidos em direcção ao fígado, a IL-1 inibe a síntese hepática de proteínas de fase aguda negativas e estimula a síntese de proteínas de fase aguda positivas em sinergia com os glucocorticóides, cuja produção é consequência da sua estimulação sobre o eixo hipofisário-adrenal.

A IL-6, uma fosfoglicoproteína de 184 aminoácidos, é produzida por uma grande diversidade de células (Yamashita, Fujinaga, Miyamoto, Hagio, Izumisawa & Knoti, 1994). Enquanto que os monócitos e os macrófagos são preferencialmente estimulados pelos lipopolissacáridos bacterianos para a síntese de IL-6, os fibroblastos e as células endoteliais são preferencialmente estimulados pela IL-1 e pelo TNF $\alpha$ , no decorrer da inflamação sistémica (Heinrich et al., 1990). Seis horas após o estímulo inflamatório, esta interleucina encontra-se em elevadas concentrações a nível hepático, e em concentrações menores no líquido sinovial, líquido cefalo-raquidiano e urina (Gillet, 2002). Com inúmeras células-alvo, destacam-se os hepatócitos onde, ao actuar através de receptores membranários (Heinrich et al., 1990), a IL-6 está envolvida essencialmente na libertação de APPs positivas (Paltrinieri, 2007). Para além de constituir o mais importante indutor na síntese hepática de proteínas de fase aguda, a IL-6 tem ainda um papel regulador na hematopoiese, assim como na regulação de funções endócrinas e nervosas (Hibi, Nakajima & Hirano, 1996).

A IL-1 é uma glicoproteína de 152 aminoácidos, que apresenta dois polipéptidos: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esta interleucina é produzida por uma grande variedade de células, tais como: monócitos, macrófagos, PMNs, linfócitos B e T, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, adipócitos e células dendríticas. Após estimulação de CD14 e TLR4, os macrófagos sintetizam IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A IL-1 $\beta$  é produzida, de um modo geral, sob a forma inactiva e, após sofrer clivagem enzimática (caspase-1), transforma-se numa molécula activa. Quantitativamente, a IL-1 $\beta$  é produzida 10 a 50 vezes mais que a IL-1 $\alpha$  e enquanto IL-1 $\beta$  é libertada para a circulação, a IL-1 $\alpha$  permanece ligada aos macrófagos. Desta forma, esta última citocina apenas actua nas células alvo que entram em contacto directo com os macrófagos (Figura 10). Quinze minutos

após ser reconhecido um agente estranho invasor, inicia-se a sua transcrição e 3 a 4 horas depois é alcançada a máxima concentração de IL-1 $\beta$ . Esta citocina actua ao nível das células endoteliais, atraindo os PMNs. A IL-1 $\beta$  tem ainda a capacidade de estimular noutros macrófagos a síntese de NOS<sub>2</sub> (monóxido de azoto sintase) e COX-2 e, assim, amplificar a inflamação. Durante inflamações graves, e em sinergia com TNF $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  em circulação actua no cérebro e desencadeia o chamado “sickness behavior” caracterizado por febre, letargia, prostração e perda de apetite (Tabela 13). A nível muscular promove a mobilização de aminoácidos, provocando dor e fadiga (Tizard, 2009). Ao atingir o fígado, a IL-1 induz a síntese de proteínas de fase aguda, incluindo a síntese de Proteína C Reactiva ao actuar em sinergia com IL-6 e amplificando a sua actividade (Gillet, 2002; Yamashita et al., 1994).

**Figura 10. Estímulos que promovem a libertação de IL-1 pelos macrófagos.** (Tizard, 2009). Imagem adaptada



**Tabela 13. Efeitos da IL-1 no organismo.** (Tizard, 2009). Tabela adaptada.

| EFEITOS DA INTERLEUCINA 1      | DESCRIÇÃO DO EFEITO / CÉLULAS ALVO  |
|--------------------------------|---|
| Efeitos pró-inflamatórios      | Induz a síntese de colagénio, a actividade dos condrócitos, a actividade dos fibroblastos e a reabsorção óssea                    |
| Efeitos citotóxicos            | Células tumorais  |
| Efeitos nos leucócitos         | Estimula a produção de citocinas pelas células TH2. Induz a desgranulação dos eosinófilos e dos basófilos                         |
| Efeitos no sistema nervoso     | Induz a febre, a perda de apetite e o sono  |
| Efeitos no crescimento celular | Estimula o crescimento de fibroblastos, queratinócitos, células da glia, mesengiais e de células do músculo liso a nível vascular |
| Efeitos nos tecidos vasculares | Induz a síntese de IFN $\gamma$ e a expressão de integrinas   |
| Efeitos metabólicos            | Estimula a produção de muco, da lipoproteína lipase, das proteínas de fase aguda e induz a mobilização de aminoácidos             |

TNF $\alpha$  é uma proteína trimérica, constituída por 157 aminoácidos e produzida essencialmente por macrófagos, mastócitos, células T, células B, células endoteliais e fibroblastos (Gillet, 2002, citado por Archer, 2008; Tizard, 2009). Após detecção dos agentes patogénicos, os macrófagos e os mastócitos produzem TNF $\alpha$  que, por sua vez, induz a libertação local de quimiocinas e citocinas e promove a adesão, migração, atracção e a activação de leucócitos no local de lesão. Ao nível dos PMNs, TNF $\alpha$  aumenta a sua capacidade para destruir microrganismos, ao atraí-los ao local de lesão e ao aumentar a sua adesão às células endoteliais. Nos macrófagos, esta proteína estimula a fagocitose, e ao promover a libertação de IL-1, NOS2 e COX-2 amplifica e prolonga a inflamação. TNF $\alpha$  activa ainda os mastócitos e destrói as células tumorais, bem como as células infectadas por vírus, através da activação de caspases e da indução da apoptose. Esta proteína constitui um importante mediador inflamatório. Um aumento da concentração de TNF $\alpha$ , a nível local, conduz aos sinais clínicos característicos da inflamação que incluem calor, edema, dor e rubor. A nível sistémico, o seu aumento conduz a um decréscimo do débito cardíaco, à trombose de pequenos vasos e à saída de fluidos do interior dos mesmos. Após actuação dos mecanismos de imunidade inata, o TNF $\alpha$  favorece a transição para a imunidade adquirida ao aumentar a apresentação dos antígenos e ao estimular a acção dos linfócitos T (Tabela 14) (Tizard, 2009).

**Tabela 14. Efeitos de TNF $\alpha$ .** (Tizard, 2009). Tabela adaptada.

| EFEITOS DE TNF $\alpha$       | DESCRIÇÃO DO EFEITO / CÉLULAS ALVO  |
|-------------------------------|---|
| <i>Promotor da inflamação</i> | Activa moléculas de adesão e procoagulantes<br>Induz a síntese de proteínas de fase aguda, promove a formação de granulomas, estimula a migração dos leucócitos e induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 |
| <i>Estimula</i>               | A síntese de colagénio, a multiplicação dos fibroblastos e a reabsorção óssea   |
| <i>Activa várias células</i>  | Mastócitos, macrófagos, linfócitos, PMNs, fibroblastos e células endoteliais  |
| <i>Efeitos tóxicos</i>        | Morte das células tumorais<br>Choque séptico<br>Alteração do metabolismo dos lípidos<br>"Sickness behavior"   |

Os glucocorticóides desempenham o papel principal na modulação da resposta de fase aguda, uma vez que estimulam a produção de proteínas de fase aguda ao actuarem em sinergia com a IL-1, a IL-6 e os factores de crescimento (Hirvonen, 2000; Gillet, 2002). Por outro lado, os glucocorticóides e os factores de crescimento inibem a expressão dos genes que codificam as citocinas e, consequentemente inibem a síntese e a libertação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e monócitos. Esta inibição permite que haja um limite na toxicidade das interleucinas e do TNF $\alpha$ , e uma diminuição da síntese das proteínas de fase aguda. As citocinas, por sua vez, ao estimularem a síntese de adrenocorticóides, geram um mecanismo de retro-alimentação negativa (feed-back negativo) através do cortisol endógeno (Gillet, 2002). Por sua vez, o cortisol permite uma diminuição da permeabilidade capilar, o recrutamento de

leucócitos, a estabilização das membranas dos lisossomas e a supressão das células do sistema imunitário (Hirvonen, 2000). Concluindo, os glucocorticoides e os factores de crescimento regulam a produção de PCR, ao modularem a libertação de citocinas e a resposta do fígado (Tabela 15).

**Tabela 15. Principais funções biológicas das citocinas IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ .** (Petersen et al., 2004).  
Tabela adaptada.

| CITOQUINAS   | FUNÇÕES ESPECÍFICAS  | FUNÇÕES COMUNS  |
|--------------|--|---|
| IL-1         | <p>Activação das células epiteliais, das células do estroma e dos condrócitos, em resposta à lesão tecidual local</p> <p>Regulação da formação de linfócitos B ao nível da medula óssea</p> <p>Mediação da infiltração local de leucócitos (via IL-8)</p> <p>Activação de osteoblastos</p> <p>Degradação óssea e das cartilagens</p> | <p>Indução da resposta de fase aguda a nível hepático</p> <p>Indução da febre</p> <p>Activação das células T, B e NK</p> <p>Indução da produção de IL-2 pelas células T</p> |
| IL-6         | <p>Indução e diferenciação de células T citotóxicas</p> <p>Estimulação da diferenciação hemotopoiética de células mãe ("stem cells")</p> <p>Modulação da produção de IL-1 e TNF</p>  |   |
| TNF $\alpha$ | <p>Indução da produção de IL-1</p> <p>Destruição celular por supressão da síntese proteica, o que resulta na caquécia do animal</p> <p>Induz a lesão local do endotélio</p>  |   |

### 2.3.3 A Proteína C Reactiva

A Proteína C Reactiva é uma das proteínas de fase aguda. Durante situações inflamatórias como infecção, trauma, queimaduras, ou neoplasias, a sua concentração aumenta, atingindo valores 100 a 1000 vezes superiores aos normais (Mahon & Tice, 2006).

Uma vez iniciado o estímulo inflamatório, lesão ou trauma, são produzidos e libertos mediadores inflamatórios que, ao atingirem o fígado através da circulação sanguínea, ligam-se a receptores membranários. A síntese da PCR inicia-se nos hepatócitos peri-portais e culmina nos hepatócitos que ocupam a posição central do lóbulo (Kushner & Feldmann, 1978). A sua concentração aumenta rápida e significativamente, em 4 a 6 horas, sendo o seu pico alcançado entre as 24 e as 48 horas. Contudo, e tal como ocorre com o seu acréscimo, o seu decréscimo é rápido após término do estímulo inflamatório – 24 a 48 horas (Mahon & Tice, 2006; Tizard, 2009).

Após exercício intenso, golpe de calor ou parto, podem verificar-se alterações moderadas nas suas concentrações, enquanto que após stress psicológico e na presença de várias doenças psiquiátricas, o que ocorre são pequenas alterações.

Apesar do aumento da PCR não ser específico, ele reflecte a presença e a intensidade da inflamação. Dado que as concentrações das proteínas de fase aguda aumentam rapidamente durante a inflamação e decrescem também de uma forma rápida após o seu término, os níveis plasmáticos da PCR são utilizados como parâmetro de diagnóstico, como factor de avaliação

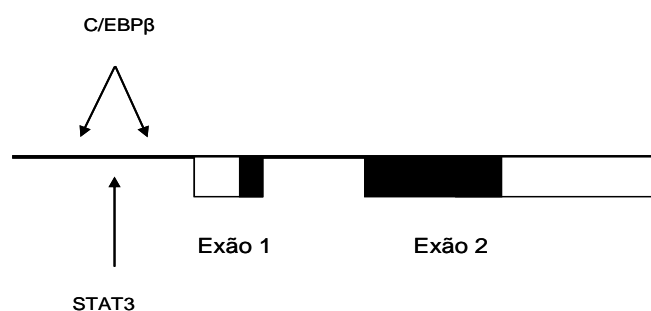
da gravidade da inflamação e para monitorizar a eficácia de um tratamento (Mahon & Tice, 2006; Ridker, 2003).

### 2.3.3.1 Síntese hepática da PCR

Para que haja síntese das APPs, é necessário uma activação das RNA polimerases, o que conduz ao aumento da síntese de RNA mensageiro. Por sua vez, uma hipertrofia do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, leva a uma activação das glicotransferases e a uma glicosilação da fracção proteica, culminando numa secreção plasmática de PCR (Vergobbi, 1992).

No Homem, o gene que codifica a PCR encontra-se no braço curto do cromossoma 1. Este contém apenas um intrão, que separa a região que codifica o sinal peptídico da região que codifica a proteína madura (Figura 11). A indução da produção da PCR nos hepatócitos é regulada principalmente a um nível transcricional pela IL-6, cujo efeito é amplificado pela IL-1 $\beta$  (Kushner et al., 1995). Ambas controlam a expressão dos genes de muitas proteínas de fase aguda através da activação dos factores de transcrição STAT3, membros da família C/EBP e proteínas Rel (NF- $\kappa$ B). A regulação de cada gene codificante das proteínas de fase aguda deve-se unicamente a acções induzidas pelas citoquinas e pelos factores de transcrição, nos seus promotores. Para a PCR, os membros da família C/EBP – C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  são essenciais para esta indução. Para além dos locais de ligação para o C/EBP, a região proximal da subunidade do gene codificante da PCR contém locais de ligação para STAT3 e proteínas Rel. As interacções entre estes factores vão resultar num aumento da estabilidade das ligações ao “DNA” e consequentemente, na máxima indução da expressão do gene (Agrawal, Samols & Kushner, 2003).

**Figura 11. Estrutura do gene da PCR.** (Marnell et al., 2005). Imagem adaptada.



*Os exões estão demonstrados por caixas, os intrões e as regiões intergénicas correspondem às linhas. Os locais de ligação para os factores de transcrição estão representados por setas. As regiões codificantes correspondem às caixas escuras.*

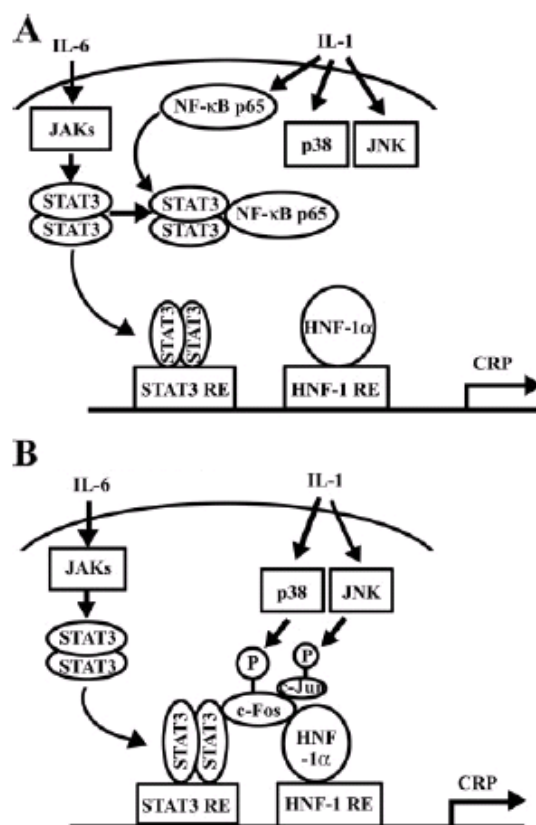
Nishikawa et al (2008) demonstraram recentemente que existem duas fases no mecanismo de transcrição do gene codificante da PCR mediado pelas citoquinas já referidas. Na primeira

fase, a IL-1 inibe o efeito da IL-6 na expressão da PCR, através da formação de um complexo entre NF- $\kappa$ B p65 e STAT3 (Figura 12 A). Já na segunda fase, a formação do complexo c-Fos-STAT3-HFN $\alpha$  é essencial para a formação da PCR mediada pela acção sinérgica da IL-1 e da IL-6 (Figura 12 B).

Estudos ultraestruturais demonstraram que a síntese e a secreção desta proteína, ocorre, à semelhança da síntese de outras proteínas, a nível intracitoplasmático, envolvendo a participação dos reticulos endoplasmáticos liso e rugoso e do complexo de Golgi (Kushner & Feldmann, 1978).

Apesar de maioritariamente ser produzida pelo fígado, a PCR é também produzida nos neurónios, pulmões, intestinos, monócitos, linfócitos e adipócitos (Jialal, Devaraj & Venugopal, 2004; Kuta & Baum, 1986). Os mecanismos que regulam a sua síntese extra-hepática são desconhecidos, mas pensa-se que não influenciam substancialmente os níveis séricos de PCR (Black, 2005).

**Figura 12. Modelo esquemático da actividade a nível transcricional mediada, pelas citoquinas no gene humano da PCR.** (Nishikawa et al., 2008).



A: fase inicial de indução, NF- $\kappa$ B p65 forma um complexo com STAT3, que inibe a Expressão do gene da PCR; B: Fase final de indução. A estimulação por parte das citocinas induz a formação de um complexo com c-Fos, STAT3, e HNF-1 $\alpha$  que induz a expressão do gene da PCR.

## 2.4 Mecanismos de acção da Proteína C Reactiva

A Proteína C Reactiva é uma proteína clássica de fase aguda (Szalai, Agrawal, Greenhough & Volanakis, 1997), cujos níveis plasmáticos podem aumentar cerca de mil vezes em resposta à lesão tecidual, infecção e inflamação, quando comparadas às suas concentrações, inferiores a 6 µg/ml, em pacientes saudáveis.

Quer a sua conservação ao longo da evolução, quer a sua produção mediada por mediadores inflamatórios, sugerem que a PCR desempenha um papel essencial na inflamação e, consequentemente, na defesa do hospedeiro (Stein et al., 2000a).

No organismo, a PCR desempenha múltiplas funções, de entre as quais se destacam: a interacção com ligandos específicos; a capacidade de activar a via clássica do sistema complemento; a estimulação da produção de citocinas inflamatórias; a opsonização de partículas, ao ligar-se a determinantes microbianos e componentes de células lesadas, facilitando o reconhecimento destas células pelos macrófagos (Du Clos, 1996; Hokama, Coleman & Riley, 1962; Mortensen, Osmand, Lint & Gewurz, 1976; Zahedi et al., 1989); a capacidade de se ligar aos receptores FcγI e FcγII (FcγRI e FcγRII respectivamente) ao nível das células fagocitárias – macrófagos (Mortensen et al., 1976; Mortensen & Duszkievicz, 1977) e PMNs (Kilpatrick & Volanakis, 1985b), estimulando a fagocitose (Black, 2005) e a influência nas actividades dos linfócitos T e B (James, Hansen & Gewurz, 1981; Whisler, Newhouse & Mortensen, 1983).

É a sua configuração cíclica e pentamérica que lhe confere a capacidade de se ligar a inúmeras bactérias patogénicas e a diversos antígenos intracelulares, libertados por células apoptóticas ou necróticas (Du Clos, 1996), reconhecendo, desta forma, as moléculas estranhas ao organismo (Gabay & Kushner, 1999) e prevenindo a auto-imunidade, uma vez que ao, ligar-se a antígenos nucleares e permitindo a sua eliminação, evita a actuação do sistema imunitário (Marnell et al., 2005).

A inflamação é um processo organizado, embora complexo, que implica o envolvimento de um grande número de células e moléculas. Estas podem iniciar, amplificar ou manter o processo inflamatório, podendo ainda atenuá-lo ou mesmo resolvê-lo (Gabay & Kushner, 1999). Tal como muitos mediadores do processo inflamatório, também a Proteína C Reactiva é multifuncional, desempenhando, muitas das vezes, actividades antagónicas. Actividades anti e pró-inflamatórias foram descritas. Foi demonstrado que a PCR induz a expressão de IL-1 (Tilg, Vannier, Vachino, Dinarello & Mier, 1993), aumenta a libertação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Mold, Baca & Du Clos, 2002a; Szalai, Nataf, Hu & Barnum, 2002) e reprime a síntese de IFNγ (Szalai et al., 2002). Ao nível dos PMNs, inibe a produção de superóxido e a sua desgranulação (Tizard, 2009).

No entanto, muitas outras funções pró-inflamatórias foram reconhecidas, para além da activação do sistema complemento e da estimulação da fagocitose já referidos. De facto, a PCR regula a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, inibe a síntese endotelial de monóxido de azoto e a sua expressão nas células endoteliais da aorta (Venugopal, Devaraj, Yuhanna, Shaul & Jialal, 2002), estimula a libertação de IL-8 por diferentes tipos de células, activa a expressão e estimula a actividade do plasminogénio e amplifica a libertação de IL-1, IL-6, IL-18 e TNF- $\alpha$  (Agrawal et al., 2003). Foi demonstrado ainda que a Proteína C Reactiva é capaz de se ligar especificamente a células mononucleares e modular a sua actividade.

Concluindo, a PCR assume um importante papel na protecção contra processos infecciosos, na eliminação de tecidos alterados, na prevenção de reacções auto-imunes e na regulação da resposta inflamatória (Mold, Rodriguez, Rodic-Polic & Du Clos, 2002c), actuando de acordo com a circunstância e o contexto em que a sua própria síntese é estimulada (Black, 2005), isto é, amplificando a resposta inflamatória quando o agente patogénico está presente no hospedeiro e inibindo a mesma resposta quando o agente é eliminado (Tilg et al., 1993).

#### **2.4.1 Capacidade de se fixar a diversos ligandos**

A PCR tem capacidade de interagir com diversos ligandos. De entre eles, o que há mais tempo é conhecido e estudado é a fosfocolina (Black, 2005; Volanakis & Kaplan, 1971). Contudo, atendendo a uma grande panóplia de investigações levadas a cabo, muitos outros ligandos foram descobertos, tais como: antigénios nucleares – cromatina (Du Clos et al., 1988); SnRNPs – “Small nuclear ribonucleoproteins” (Du Clos, 1989); lecitinas – fosfoetanolamina (Schwalbe et al., 1992), lisolecitina; glicoproteínas – laminina (Kresl et al., 1999); fibronectina (Salonen, Vartio, Hedman & Vaheri, 1984); esfingomiélin; certos poli-aníões (por exemplo, o ácido desoxirribonucleico); moléculas policatiónicas – protamina, histonas, heparina (Di Camelli et al., 1980); lípidos (lipossomas, lipoproteínas, apolipoproteínas como o LDL responsável pelo transporte do colesterol) entre outros (Agrawal et al., 2002; Black et al., 2003; Du Clos et al., 1988; Gillet A., 2002; Lee et al., 2002; Oliveira et al., 1980; Potempa et al., 1981; Robey et al., 1984; Szalai et al., 1999).

Geralmente, esta capacidade é classificada em duas grandes categorias, de acordo com a necessidade ou não da presença do ião cálcio. Apesar da maioria das ligações exigirem a presença do referido ião, estão descritas algumas excepções, tais como: as que ocorrem com componentes poli-iónicos, poli L-lisina, heparina, mielina, fibronectina e proteínas catiónicas leucocitárias (Kushner et al., 1981). Foi, inclusivamente, demonstrado que estas ligações são inibidas pela presença do já referido ião.



Uma vez formado, o complexo PCR-ligando conduz à activação da via clássica do sistema complemento, através da sua ligação à fracção C1q, sendo por meio do mesmo que os referidos ligandos serão eliminados do organismo, tornando o papel da PCR fulcral para a defesa do hospedeiro (Black, 2005).

#### **2.4.2 Activação do Sistema Complemento através da sua via clássica**

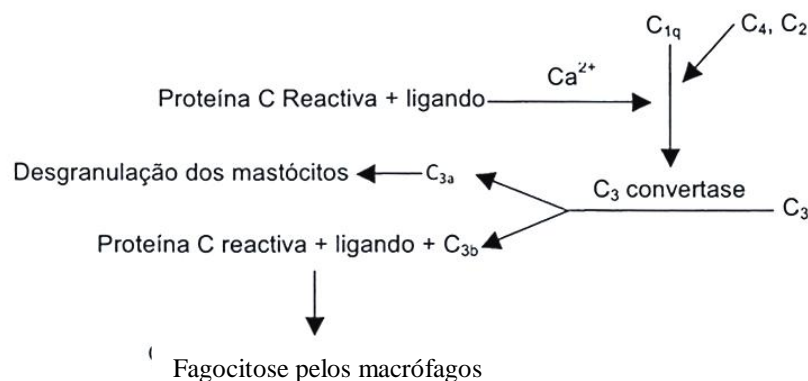
O sistema complemento é constituído por cerca de 30 proteínas instáveis, produzidas pelo fígado e encontrando-se a maioria ao nível do soro na sua forma inactiva. Estas proteínas desempenham um importante papel no mecanismo de defesa contra agentes infecciosos e na resposta inflamatória (Walport, 2001).

Existem três diferentes vias, através das quais o sistema complemento pode ser activado: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas (Walport, 2001). A PCR utiliza a via clássica para a activação do Sistema Complemento.

Os componentes mais importantes da via clássica são C1-C9 (C1 apresenta três proteínas distintas: C1q, C1r; C1s), sendo esta via iniciada pela ligação de imunocomplexos à fracção C1q. A fase inicial de activação gera produtos de clivagem C3 e C4 que actuam como opsoninas. A última fase da via clássica envolve a activação do complexo de ataque membranário C5-C9, que tem uma elevada acção anti-inflamatória, dando origem a poderosos péptidos quimiotácticos, responsáveis pela lise de bactérias e outras células às quais se ligam (Black, 2005).

O complexo PCR-C1q conduz à formação de C3 convertase (Mold, Gewurz & Du Clos, 1999), de forma semelhante ao que acontece com a activação do sistema complemento por complexos antigénio-anticorpo (Ag-Ac). Por sua vez, a C3 convertase transforma a fracção C3 do complemento em C3a (fragmento menor), que participa na desgranulação dos mastócitos, conduz à libertação de histamina e é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular com consequente saída de proteínas plasmáticas do lúmen vascular e formação de edema inflamatório. O complexo C3b-ligando-PCR, formado na superfície da célula-alvo, é reconhecido pelos macrófagos ao nível do receptor membranário de C3b, sendo opsonizado e fagocitado (Vergobbi, 1992 citado por Archer, 2008) (Figura 13).

**Figura 13. Activação da via clássica do Sistema Complemento pela PCR.** (Archer, 2008). Imagem adaptada.



No entanto, o estudo da activação do sistema complemento pela PCR, concluiu que este se limita essencialmente à sua fase inicial, caracterizando-se, desta forma, por um forte envolvimento das proteínas C1-C4 e uma fraca activação de C5-C9 (Mold et al., 1999), o que difere da activação do sistema complemento por complexos imunes, uma vez que, neste caso, a última fase é fortemente activada. A diferença entre a activação do complemento pela PCR e o que resulta de complexos Ag-Ac, deve-se, essencialmente, à capacidade da PCR interagir com o factor H (FH), aumentando a sua interacção com C3b e com a proteína de ligação de C4b (C4BP) (Sjöberg, Trown, McGrath, Hack & Bloom, 2006), o que conduz à inibição das vias que resultam na formação de C5 convertase (Giannakis et al., 2003; Jarva, Jokiranta, Hellwage, Zipfel & Meri, 1999). Como resultado, a forte resposta inflamatória, tipicamente associada com C5 e com a formação do complexo de ataque membranário C5-C9, é reduzida. Jarva et al (1999) concluíram que a ligação da PCR não interfere negativamente com a função de FH, e que o objectivo primordial da PCR é suprimir a activação do sistema complemento pela via alternativa e acelerar a inactivação da conversão de C3b a iC3b nos locais de lesão. Por outro lado, ao redistribuir e concentrar o FH nas áreas de isquémia, permite a eliminação das zonas lesadas através do receptor C3 (CR3).

Concluindo, a PCR participa nas primeiras linhas de defesa do organismo e limita os efeitos potencialmente nocivos da inflamação levados a cabo pelos componentes envolvidos na última fase do sistema complemento. A sua ligação a factores reguladores do referido sistema (FH e C4BP), evita a lesão tecidular induzida pela activação excessiva do sistema complemento (Sjöberg et al., 2006).

### 2.4.3 Estimulação da fagocitose

O sistema de imunidade inata é responsável pelo reconhecimento de bactérias, fungos e uma variedade de outros agentes patogénicos. Adicionalmente, o sistema imunitário inato, reconhece células necróticas e apoptóticas e ainda auto-antígenos libertados por aquelas células. Uma das famílias de proteínas que funciona tal como o sistema imunitário inato, por reconhecimento de determinadas moléculas, é a família das pentraxinas, da qual a PCR faz parte (Du Clos, 2000; Gewurz, Zhang & Lint, 1995).

Efeitos funcionais da Proteína C Reactiva em células fagocíticas, bem como a sua ligação a tais células, estão desde há muito comprovados. Contudo, só recentemente foi descoberto que seriam os receptores Fcγ os envolvidos nessa mesma ligação (Salmon & Pricop, 2001).

Os receptores Fc encontram-se na superfície de variadas células tais como mastócitos, monócitos, macrófagos, PMNs e células da linha mielóide (Stein, Mold & Du Clos 2000b), sendo a fagocitose uma das suas principais actividades (van de Winkel & Anderson, 1991), o que contribui para a eficácia da protecção estabelecida pela sistema imunitário, mediada especificamente pelas IgG (Bharadwaj, Stein, Volzer, Mold & Du Clos, 1999; Stein et al., 2000b). Desta forma, a Proteína C Reactiva é considerada uma das moléculas que estabelece a ligação entre as respostas sistémicas precoces e a subsequente imunidade específica (Du Clos & Mold, 2001; Fearon & Locksley R.M., 1996; Mortensen, 2001), através da capacidade em interagir com FcγR. Esta conexão é importante, uma vez que facilita o desenvolvimento de uma imunidade adaptativa precoce, o que torna a resposta antibacteriana mais eficiente (Du Clos & Mold, 2001).

Existem três classes de receptores, Fcγ – FcγRI, FcγRII e FcγRIII descritas (Hulett & Hogarth, 1994; Stein et al., 2000a; Stein et al., 2000b; Unkeless, Scigliano & Freedman, 1988). FcγRI, o receptor com elevada afinidade para a IgG, é expresso primariamente em monócitos e macrófagos. FcγRII, que tal como FcγRIII apresenta baixa afinidade para a IgG, está presente em linfócitos, macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), plaquetas e mastócitos. FcγRIII é expresso como uma proteína transmembranária, presente nos PMNs, macrófagos, células NK e mastócitos e, tal como FcγRI, é capaz de mediar a fagocitose (Mold, Gresham & Du Clos, 2001). Inicialmente, estudos confirmaram que a PCR interagia especificamente e com elevada afinidade com o receptor FcγRI, já conhecido como receptor para a IgG (Crowell, Du Clos, Montoya, Heaphy & Mold, 1991; Marnell, Mold, Vollzer, Burlingame & Du Clos, 1995). Estudos posteriores revelaram que a PCR interagia com células mononucleares através de FcγRI, verificando-se também que este receptor não estava envolvido em todas as ligações. Chegou-se então à conclusão que seria FcγRIII a interagir com elevada afinidade com a PCR,

e que seria este, na verdade, o principal receptor para a mesma. FcγRIIa encontra-se presente ao nível dos monócitos, macrófagos, PMNs e células B (Bharadwaj et al., 1999; Stein et al., 2000a; Stein et al., 2000b).

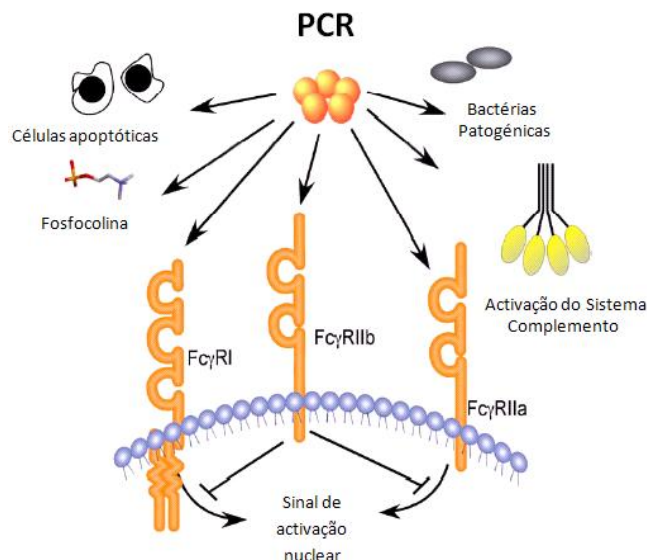
No entanto, Stein et al (2000a) verificaram alterações individuais na capacidade da PCR se ligar a FcγRIIa, concluindo que estas mesmas se deviam a um polimorfismo num simples nucleótido, que produzia a diferença de um único aminoácido da posição 131: arginina (R) ou histidina (H). Os seus resultados demonstraram ainda que a afinidade da PCR se ligar a monócitos e PMNs é muito maior nos dadores homozigóticos R-131 quando comparados aos heterozigóticos H-131/R-131 e muito inferior nos dadores homozigóticos H-131. Outra descoberta interessante é a de que nos monócitos de dadores homozigóticos H-131, a afinidade da PCR aumenta na presença de IFγ, o que sugere que numa situação inflamatória a presença de mediadores inflamatórios aumenta a afinidade da PCR para os receptores, independentemente da posição 131 ser ocupada pelos aminoácidos arginina ou histidina.

Nos locais de lesão tecidular e inflamação, os PMNs e macrófagos libertam várias proteases tais como, elastase e catepsina G, aumentando a capacidade de ligação dos mesmos à PCR, o que conduz, por sua vez, a um aumento da capacidade de destruição das bactérias patogénicas e das células lesadas nestes locais. Por sua vez, a ligação da PCR aos macrófagos resulta na produção de compostos que reagem com o oxigénio, proteases e citocinas, que conduz à activação da acção anti-tumoral dos mesmos (Zahedi & Mortensen, 1986) e na indução selectiva da fagocitose (Bharadwaj, Mold, Markham & Du Clos, 2001; Chi, Tidandapani, Zhong, Coggeshall & Mortensen, 2002; Mortesen & Duszkievicz, 1977).

É ainda importante referir que na actualidade se distinguem, nos receptores Fcγ, dois diferentes tipos de domínios, os domínios estimulatórios, caracterizados por uma sequência citoplasmática ITAM (“immunoreceptor tyrosine-based activation motif”) e um domínio inibitório, caracterizado pela sequência ITIM (“immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif”). As respostas biológicas, mediadas por ITAM, incluem fagocitose, secreção de citocinas, a indução da “burst” oxidativa e da desgranulação que, na presença do domínio inibitório, serão bloqueadas (Salmon & Pricop, 2001). Foi demonstrada a capacidade da Proteína C Reactiva se ligar a ambos os tipos de domínios, estimulatórios e inibitório, existentes quer em FcγRI quer em FcγRII (Hundt, Zielinska-Skowronek & Schmidt, 2001).

Concluindo, a estimulação da fagocitose mediada pela PCR pode ser feita quer pela activação do sistema complemento, quer através da sua ligação aos receptores Fcγ, tal como se verificou experimentalmente em inúmeras bactérias, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogens* (Kindmarck, 1971) (Figura 14).

**Figura 14. Ligandos da PCR.** (Marnell et al., 2005). Imagem adaptada.



O ligando protótipo da PCR é a fosfocolina, presente na parede de muitas bactérias e na membrana de várias células lesadas.

#### 2.4.4 Capacidade de defesa contra múltiplas infecções bacterianas

A capacidade de defesa por parte da Proteína C Reactiva contra infecções bacterianas, provocadas por diferentes espécies, é-lhe há muito reconhecida. Naquelas espécies incluem-se: *Streptococcus pneumoniae* (Mold, Nakayama, Holzer, Gewurz & Du Clos, 1981; Szalai, Briles & Volanakis, 1995), *Haemophilus influenza* (Lysenko et al., 2000; Weiser et al., 1998b) e *typhimurium*, um serovar da *Salmonella* entérica. A protecção é presumivelmente mediada através da ligação da PCR à molécula de fosfocolina (Fox et al., 2008; Lysenko et al., 2000) ou fosfoetanolamina presentes nas células bacterianas. Após formação do complexo, segue-se a activação do sistema complemento por interacção da PCR com a fracção C1q, culminando com a destruição das bactérias – actividade bactericida (Weiser et al., 1998b).

##### 2.4.4.1 Efeito protector da PCR humana em ratos infectados por *Streptococcus pneumoniae*

Em contraste com os humanos, em que durante a fase aguda as concentrações plasmáticas da PCR atingem níveis elevadíssimos, nos ratos a PCR raramente excede os 2 µg/ml (Pepys, Baltz, Gomer, Davies & Doenhoff, 1979), uma vez que nesta espécie, esta não é uma proteína de fase aguda. Este facto permitiu que fossem realizados extensivos estudos sobre a protecção exercida pela PCR humana em ratos infectados por várias estirpes de *Streptococcus pneumoniae* (Horowitz, Volanakis & Briles, 1987; Mold et al., 1981; Nakayama, Gewurz, Holzer, Du Clos & Mold, 1983; Yother, Volanakis & Brilles, 1982).

Em 1981, um estudo demonstrou o papel importante da PCR na defesa do hospedeiro, infectando murganhos com *Streptococcus pneumoniae* (serótipos 3 e 4) e injectando, *a posteriori*, PCR humana. Verificou-se então, que a PCR apresentava a capacidade de opsonizar esta bactéria, uma vez que a protecção foi demonstrada, quer em murganhos normais, quer em murganhos com deficiência em anticorpos específicos para a fosfocolina (Mold et al., 1981). Em 1983 foi demonstrado que a protecção exercida pela PCR está associada com um aumento da apreensão do *Streptococcus pneumoniae* (tipo 3) a nível esplénico e uma diminuição da mesma a nível hepático, confirmada pela necessidade de doses de PCR 300 vezes superiores nos ratos submetidos a esplenectomia, relativamente a ratos normais, de forma a que a protecção levada a cabo pela PCR fosse, realmente, eficaz (Nakayama et al, 1983).

Em 1996 surge um outro importante estudo, no qual se conclui que a protecção exercida pela PCR relativamente ao *Streptococcus pneumoniae* requer um sistema complemento funcional e intacto (Mold, Rodic-Polic & Du Clos, 2002b; Szalai, Briles & Volanakis, 1996). Foi demonstrado que a PCR humana é capaz de desenvolver, nesta espécie, uma autêntica resposta de fase aguda, responsável por um decréscimo da bacteriémia, um aumento do tempo de sobrevivência e uma redução na taxa de mortalidade após a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Inicialmente, era defendido que o mecanismo de acção da PCR envolveria a capacidade da mesma reconhecer e ligar-se à bactéria através da fosfocolina existente na sua superfície e, posteriormente, activar o sistema complemento através do complexo PCR-ligando recém-formado, e em menor grau pela sua capacidade de interagir com células fagocíticas e estimular a fagocitose. Mais tarde, aquela conclusão foi novamente demonstrada, verificando-se que é realmente o sistema complemento o principal responsável pela defesa contra a infecção mas que, na ausência deste, a PCR consegue numa fase precoce, por si só, assegurar alguma protecção através da fagocitose mediada pela ligação aos receptores Fcγ de monócitos, macrófagos e PMNs (Marnell et al., 1995).

Em 2002, um outro estudo publicado demonstrou que a já então estabelecida protecção que a Proteína C Reactiva exerce face à infecção causada por *Streptococcus pneumoniae* se deve a mecanismos dependentes do sistema complemento. Foi então testado o papel dos receptores Fcγ e do complemento na protecção contra a infecção sistémica deste agente patogénico, quer mediada pela PCR, quer por anticorpos anti-fosfocolina. As conclusões foram as seguintes: em primeiro lugar, as opsoninas, PCR e anticorpos anti-fosfocolina requerem a acção do sistema complemento para que efectivamente se verifique a protecção perante a infecção; em segundo, nem a PCR nem os anticorpos requerem o envolvimento dos receptores Fcγ e, em último, os murganhos com deficiência na cadeia γ apresentavam uma

maior susceptibilidade à infecção, sucumbindo mais facilmente. Apesar deste aumento de susceptibilidade não ter sido completamente esclarecido, pensou-se então naquela altura que se devia provavelmente a um decréscimo na formação de anticorpos específicos para a fosfocolina, apontando-se uma deficiência na apresentação dos antigénios ao sistema imunitário pelo FcγRI (Wernersson et al., 1999) como possível causa (Mold et al., 2002b).

Mais tarde, Suresh et al (2007) decidiram investigar também o mecanismo de protecção mediado pela PCR em ratos infectados por *Streptococcus pneumoniae*, chegando a conclusões surpreendentes. Ao testarem a hipótese da mesma protecção envolver a ligação da PCR à bactéria, como se defendia até então, compararam a capacidade da PCR normal e de uma PCR mutante, sem capacidade para se ligar à bactéria, proteger os ratos infectados. Verificaram, então, que ambos os tipos de Proteínas C Reactiva provocaram um decréscimo da taxa de mortalidade e prolongaram o tempo de sobrevivência dos ratos infectados. Assim, a capacidade da PCR se ligar à bactéria mostrou-se irrelevante na conferida protecção. Demonstraram igualmente que ambos os tipos de Proteínas C Reactiva aumentaram a resistência à infecção devido à manutenção de uma bacteriémia reduzida e que o efeito protector não se verificou quando a PCR foi inoculada 36 horas após infecção. Verificaram também que a PCR não induz qualquer decréscimo na bacteriémia, nas primeiras 24 horas de infecção. No entanto, a PCR contribuiu para a redução da bacteriémia após essas 24 horas e preveniu o aumento da mesma nas fases seguintes. Concluindo, a acção da PCR na protecção de ratos infectados não requer a sua ligação ao *Streptococcus pneumoniae* (Suresh, Singh, Ferguson & Agrawal, 2007).

Apesar do que antes ficou dito, se a PCR apenas activa o sistema complemento quando estabelece uma ligação com um ligando (Kaplan & Volanakis, 1974; Siegel, Rent & Gewurz, 1974; Kishore et al., 2004) e se a ligação da PCR à bactéria não está envolvida na protecção dos ratos infectados, então a propriedade do complexo activar o sistema complemento também o não está. Contudo, Suresh et al (2007) não negaram a importância da participação do sistema complemento no desenvolvimento da protecção perante a infecção, adiantando que este seria activado pelo próprio *Streptococcus pneumoniae* e não pelo complexo PCR-ligando. Desta forma, a protecção eficaz envolve efeitos combinados mas independentes, quer do sistema complemento quer da PCR. Suresh et al (2007) sugeriram que o complemento estabelece uma primeira linha de defesa, enquanto que a PCR protege os ratos das bactérias que escaparam a um primeiro ataque protagonizado pelo mesmo, ligando-se ao complexo Factor H-*Streptococcus pneumoniae* e prevenindo que o agente patogénico escape uma segunda vez.

Para além de tudo isto, verificou-se ainda que a PCR também protege ratos infectados por agentes que não interagem com o factor H e, perante este facto, foi sugerido que a protecção mediada pela PCR se devia à sua acção directa em células efectoras do sistema imunitário (Suresh et al., 2007).

Conclui-se, então, que *in vivo* a PCR comporta-se como uma molécula supervisora que destrói as bactérias que escaparam ao sistema complemento, aos TLRs (receptores “Toll-like”) e provavelmente à morte mediada pelas Células T CD4<sup>+</sup> (Suresh, et al., 2007).

#### **2.4.4.2 Efeito protector da PCR humana em ratos infectados pelo serovar *typhimurium* da *Salmonella* entérica**

Através da capacidade de se ligar a bactérias Gram positivas, demonstrou-se que a PCR tem efectivamente uma acção bactericida em ratos infectados por *Streptococcus pneumoniae*. Foi com base neste postulado, que se testou a capacidade de protecção desta proteína face a agentes Gram negativos, utilizando-se ratos infectados pela *Salmonella typhimurium*. Foi o grupo de ratos onde, *a posteriori*, se inoculou PCR humana, que apresentou um maior tempo de sobrevivência e um decréscimo na taxa de mortalidade, relativamente ao grupo controlo em que não se administrou pós-infecção a PCR humana. Esta maior resistência atribuiu-se a um acréscimo precoce (0 a 4 horas) da actividade bactericida a nível sistémico e a um decréscimo significativo do número de bactérias presentes no baço e no fígado 7 dias após infecção. Adicionalmente, 14 dias após a infecção o título de IgG no soro dos ratos que constituíram o grupo de estudo revelou-se superior. Ficou, assim, demonstrado que a PCR desempenha um importante papel *in vivo* na defesa do hospedeiro, quer durante os estádios precoces da infecção por *Salmonella*, quer em fases mais tardias da mesma, ao amplificar a resposta humoral (Szalai, VanCott, McGhee, Volanakis & Benjamin, 2000).

A actividade bactericida foi explicada, neste estudo, pela capacidade da PCR se ligar ao grupo polar da cabeça da fosfoetanolamina, o principal fosfolípido presente nas membranas celulares de bactérias Gram negativas. Após a ligação, a Proteína C Reactiva tem capacidade para opsonizar directamente a bactéria, podendo alternativamente activar, através da sua via clássica, o sistema complemento, que através dos seus produtos opsonizará as bactérias em circulação (Szalai et al., 2000).

#### **2.4.4.3 Efeito anti-bacteriano da PCR humana ao nível do tracto respiratório superior**

Já é sabido que a PCR se liga, numa forma dependente do cálcio, à fosfocolina (Volanakis & Kaplan, 1971). Para além do já tão falado *Streptococcus pneumoniae*, muitas outras espécies



bacterianas que normalmente se encontram no tracto respiratório, expressam fosfocolina na sua superfície, tais como: *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, várias espécies de *Actinomyces*, *Neisseria* e *Mycoplasma* como *Mycoplasma fermentans* (Deutsch, Salman & Rottem, 1995; Gmur, Thurnheer & Guggenheim, 1999; Mosser & Tomasz, 1970; Schenkein et al., 1999; Schenkein, Barbour, Berry, Kipps & Tew, 2000; Weiser, Goldberg, Pan, Wilson & Virji 1998a; Weiser, Shchepetov & Chong, 1997). Foi demonstrado que a fosfocolina contribui para a sobrevivência destas bactérias no tracto respiratório do hospedeiro, para além de permitir a invasão bacteriana das células epiteliais através da interacção com o receptor do factor de activação plaquetária (rPAF), cujo ligando natural, PAF, também contém fosfocolina (Deutsch et al., 1995; Swords et al., 2000). Assim, a PCR, através da ligação específica à molécula de fosfocolina, contribui para a imunidade inata do tracto respiratório, apresentando uma actividade bactericida dependente da activação do sistema complemento (Weiser et al., 1998a).

Gould e Weiser demonstraram em 2001 que a PCR se encontrava no tracto respiratório superior do homem, admitindo que as células epiteliais da mucosa do mesmo tracto poderiam ser a fonte desta proteína. Mostraram posteriormente que a PCR isolada da superfície da mucosa respiratória apresentava uma actividade antimicrobiana (Gould & Weiser, 2001). Para além da sua actividade antimicrobiana foram confirmadas outras importantes funções, tais como: a opsonização de bactérias residentes no tracto respiratório superior, o bloqueio da fixação da fosfocolina bacteriana ao rPAF e consequente inibição da fixação e invasão bacteriana das células epiteliais (Cundell, Gerard, Gerard, Idanpaan-Heikkila & Tuomanen, 1995; Swords et al., 2000), a modulação da resposta imunitária, sendo ainda provável a sua contribuição na defesa inata das vias respiratórias inferiores durante infecções provocadas por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (Szalai et al., 1995).

#### **2.4.5 Estimulação da libertação de citocinas inflamatórias pelos monócitos**

Foi demonstrado que a Proteína C Reactiva é capaz de se ligar especificamente a células mononucleares e modular a sua actividade. Balou e Lozanski (1998) investigaram de que forma a PCR afecta a capacidade destas células produzirem citocinas inflamatórias, quantificando, numa cultura de monócitos após inoculação de PCR, os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ . Verificaram que esta proteína aumenta rapidamente a libertação de cada uma das citocinas referidas, 4 horas após a sua inoculação, e que os níveis máximos de TNF $\alpha$  são atingidos às 8 horas e de IL-1 $\beta$  e IL-6 às 16 horas. Chegaram, também, à conclusão que a quantidade de cada uma das citocinas libertas, é directamente proporcional à concentração

da PCR e que um acréscimo de 50 µg/ml resultava numa libertação dez vezes superior de cada uma das já referidas citocinas.

#### **2.4.6 Supressão dos efeitos nocivos despoletados pelos mediadores inflamatórios**

Os efeitos protectores exercidos pela PCR não se limitam apenas à sua capacidade bactericida. A Proteína C reactiva evidenciou que assume, igualmente um papel de defesa perante uma variedade de condições inflamatórias, protegendo ratos do efeito letal de lipopolissacáridos (LPS) bacterianos e outros mediadores inflamatórios (Xia & Samols, 1997), tal como o factor de activação de plaquetas (PAF).

Os LPS, estruturas moleculares conservadas, são componentes da membrana celular de bactérias Gram negativas, reconhecidos por receptores existentes nas células de imunidade inata (Arosa et al., 2007).

PAF é uma substância produzida pelo sistema imunológico que conduz à agregação e desgranulação das plaquetas sanguíneas (Blood & Sttuddert, 2002).

Os constituintes das paredes celulares bacterianas, as endotoxinas no geral ou os LPS em particular, constituem poderosos agentes causais do choque endotoxínico induzido por bactérias Gram negativas (Rietschel et al., 1994). Baixos níveis circulantes (µg/ml) activam os leucócitos e levam ao aparecimento de febre, hipotensão, taquicardia e taquipneia. O choque endotoxínico progride rapidamente, origina múltiplas lesões orgânicas e conduz à morte em poucas horas (Bone, 1991; Glauser, Zanetti, Baumgartner & Cohen, 1991). No sangue, o LPS liga-se a uma proteína específica e este complexo interage com os receptores CD14 ao nível de vários tipos de células inflamatórias (Ulevitch & Tobias, 1994). Em resposta a esta interacção, mediadores inflamatórios, tais como: PAF, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , são rapidamente produzidos. Estes mediadores inflamatórios são, por si só, capazes de induzir um síndrome semelhante ao choque produzido por LPS (Lowry & Moldawer, 1993). Alguns factores endógenos como o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) (Ohlsson, Björk, Bergenfeldt, Hageman & Thompson, 1990; Wakabayashi, Gelfand, Burke, Thompson & Dinarello, 1991) e IL-4 produzidos durante a inflamação, podem reduzir esta reacção (Bone, 1991). Outros antagonistas destes mediadores, ou inibidores dos processos enzimáticos responsáveis pela produção de citocinas, são capazes de bloquear o choque endotoxínico induzido por LPS (Stone, 1994).

Em 1997, num estudo publicado, é demonstrado que a PCR de coelhos protege ratos transgénicos da mortalidade induzida por LPS, pela acção combinada de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$ , e por PAF. Esta protecção face aos mediadores do choque séptico, não se deve a um simples sequestro ou opsonização dos mesmos por parte da PCR, mas reflecte alterações nos

mecanismos de defesa do hospedeiro, mediados pela interacção de PCR com LPS e PAF (Xia & Samols, 1997). Apesar de não exercer efeitos inibitórios directos sobre as citocinas, a PCR tem capacidade de bloquear a produção prejudicial de citocinas induzidas por LPS. Em células mononucleares periféricas (PBMC – “peripheral blood mononuclear cells”) a PCR estimula essencialmente a produção de IL-1ra em detrimento de IL-1 $\beta$ , cuja estimulação é inferior (Tilg et al., 1993). *In vitro* a PCR bloqueia a mobilização de cálcio induzida por PAF (Foldes-Filep, Filep & Sirois, 1992), a produção de  $\beta$ -glucuronidase e a libertação do anião superóxido (Filep & Foldes-Filep, 1989) pelos macrófagos. Nos PMNs a PCR bloqueia a libertação do anião superóxido induzido por PAF (Foldes-Filep et al., 1992) e nas plaquetas a PCR bloqueia a libertação de ácido araquidónico induzido por PAF e a agregação plaquetária (Kilpatrick & Virella, 1985a; Vigo, 1985). A prevenção da agregação plaquetária pela PCR não requer a sua ligação a PAF, uma vez que a primeira estabiliza as membranas plaquetárias, e desta forma bloqueia a agregação e a lise das plaquetas que seriam induzidas por PAF (Vigo, 1985). A PCR afecta, deste modo os efeitos tóxicos produzidos por PAF através de mecanismos que vão para além da sua simples capacidade de o sequestrar.

A capacidade de interagir com os leucócitos mostrou-se bastante complexa, sendo difícil, por esse facto, determinar o seu preciso mecanismo de acção. Uma possibilidade avançada por Xia e Samols (1997) é a capacidade da PCR suprimir a síntese de citocinas ao nível de diferentes tipos de células inflamatórias, cuja produção é estimulada por mediadores do choque séptico ou outros agentes inflamatórios.

A capacidade da Proteína C Reactiva humana (Noursadeghi, Bieckerstaff, Gallimore, Cohen & Pepys, 2000) e de coelho (Xia & Samols, 1997) protegerem os ratos expostos a doses letais de LPS, foi demonstrada através da sua inoculação nesta espécie. A capacidade da PCR se ligar aos FCyRI e FcyRIIb já estava estabelecida (Stein et al, 2000b). Um estudo de Mold et al., publicado em 2002, testou a necessidade desta ligação na protecção mediada pela PCR em ratos inoculados com doses letais de LPS. Com este objectivo, constituíram-se dois grupos: um grupo controlo de ratos normais, e um segundo grupo constituído por ratos com deficiência nos receptores Fcy. Em ambos os grupos, administraram-se 500  $\mu$ g de PCR humana e 500  $\mu$ g de LPS no tempo 0, reforçando-se a PCR humana com uma dose de 250  $\mu$ g, 12 horas mais tarde. Verificou-se, no grupo de ratos com deficiência em FcyRII, uma maior mortalidade, um aumento dos níveis séricos de TNF $\alpha$ , um dos mais importantes mediadores de inflamação e de lesão tecidular, um aumento de IL-12 em resposta a LPS e uma ausência de protecção por parte da PCR (Mold et al., 2002c). A IL-12 é uma molécula pró-inflamatória e, tal como TNF $\alpha$ , associada à mortalidade induzida por LPS (Gerber & Mosser, 2001; Wysocka et al., 1995). Em contrapartida, no grupo de ratos normais, verificou-se um efeito protector por



também para o controlo da gravidade da lesão tecidual (Ben-Baruch, Michiel & Oppenheim, 1995; Lloyd & Oppenheim, 1992; Schall & Bacon, 1994).

A IL-8, uma quimioquina, medeia o recrutamento e a migração de PMNs desde o sangue até ao local de lesão (Baggiolini, Dewald & Moser, 1994; Schall & Bacon, 1994).

Os níveis elevados de IL-8, associados a condições de inflamação aguda, estão, desta forma, relacionados com a extensão da infiltração neutrofílica, bem como com o aumento dos níveis plasmáticos da PCR (Ballou & Kushner, 1992).

De entre as suas várias funções, está descrito que a PCR influencia a actividade leucocitária e é capaz de inibir a quimiotaxia (Zhong et al., 1998). Após ser produzida, a PCR acumula-se no local de lesão (DuClos, Mold, Paterson, Alroy & Gewurz, 1981; Kushner & Kaplan, 1961) onde é digerida pelos PMNs e transformada em péptidos que inibem a resposta quimiotáctica dos PMNs, mediada pela IL-8 e pelo FMLPP (formil-metionil-leucil-fenilalanina-fenilalanina), um péptido quimiotáctico bacteriano (Zhong et al., 1998). Esta inibição faz-se através de diferentes mecanismos que estão a ser estudados. Sabe-se porém, que esta poderá ser dependente de PI-3K (fosfatidilinositol 3-cinase), ou mediada através da inibição da actividade de pequenas proteínas G que regulam as funções do citoesqueleto dos PMNs (Quinn, 1995).

#### **2.4.8 Inibição da agregação e estabilização das membranas plaquetárias**

A resposta local perante uma lesão tecidual ou infecção, constitui uma inflamação aguda. A maior manifestação clínica resulta de alterações na permeabilidade vascular, atracção de leucócitos e febre (Hurley, 1972; Atkins & Bodel, 1979). É este fenómeno, designado por resposta de fase aguda, que permite a sobrevivência no período imediatamente após a lesão (Kushner, 1982).

Após ser sintetizada pelo fígado, a PCR é transportada pelo sangue até aos locais de inflamação (Macintyre, Schultz & Kushner, 1982). Neste local, a PCR tem capacidade de se ligar a PAF e modular a sua actividade (Benveniste, Roubin, Chignard, Jouvin-Marche & Le Couedic, 1982), activando as plaquetas, favorecendo a ligação dos leucócitos às células endoteliais e aumentando a permeabilidade vascular (Stimler et al., 1981; O' Flaherty et al., 1981).

Assim, durante a primeira fase da resposta aguda, a PCR inibe a agregação plaquetária induzida por PAF ao ligar-se a este factor e aos fosfolípidos das membranas plaquetárias. Uma vez ligada às membranas das plaquetas, protege-as do efeito detergente dos lisolípidos e da acção das fosfolipases. Ao proteger as membranas do efeito detergente, impede a sua ruptura, o que lhe confere um importante papel na reparação tecidual. A inibição das fosfolipases por parte da PCR, resulta na inibição da libertação de ácido araquidónico,

bloqueando, deste modo, a produção de mediadores inflamatórios, como os leucotrienos e os tromboxanos. Desta forma, a PCR desempenha um mecanismo de protecção logo após lesão, infecção ou trauma (Vigo, 1985).

#### **2.4.9 Estimulação da actividade procoagulante**

A ligação entre a inflamação e a coagulação pode envolver o Factor Tecidual, uma glicoproteína membranária que inicia a via extrínseca de coagulação (Bach, 1988). O complexo Factor Tecidual- Factor VIIa activa directamente o Factor X, ou indirectamente o Factor IX, conduzindo essencialmente à formação de trombina (Osterud & Rapaport, 1977). Nas células endoteliais (Carlsen, Stinessen & Prydz, 1987; Conway, Bach, Rosenberg & Konigsberg, 1989; Scarpati & Sadler, 1989; Nawroth, Handley, Esmon & Stern, 1986b) monócitos e macrófagos, a indução da expressão do Factor Tecidual (Prydz & Allison, 1978) associada com o aumento da actividade procoagulante, verifica-se na presença de vários agentes, incluindo mediadores inflamatórios, como as endotoxinas (LPS) (Rivers, Hathaway & Weston, 1975) ou as citoquinas (TNF e IL-1) (Conkling, Greenberg & Weinberg, 1988). A PCR pode também desempenhar um papel importante na actividade procoagulante (Whisler, Proctor, Downs & Mortensen, 1986), estimulando a síntese do Factor Tecidual nos locais de inflamação e lesão tecidual, o que constitui outra importante função dos monócitos (Foldes-Filep et al, 1992; Zahedi & Mortensen, 1989; Zeller, Landay, Lint & Gewurz, 1986) mediada pela PCR através da interacção com um receptor específico presente nestas mesmas células (Tebo & Mortensen, 1990; Tebo & Mortensen, 1991), ou auxiliada pela própria capacidade de activar o sistema complemento (Wickham, Vercelloti, Hammerschmidt & Jacob 1991).

A capacidade da Proteína C Reactiva, por si só, ser capaz de induzir a expressão do Factor Tecidual nos monócitos, torna-se importante para a manutenção da actividade procoagulante a níveis elevados, quando o LPS deixa de ter capacidade para o fazer durante a inflamação. Foi especulado que esta manutenção na produção do Factor Tecidual permite que, de uma forma mais eficiente, as células inflamatórias inibam a formação local de fibrina por parte das bactérias (Cermak et al., 1993).

#### **2.4.10 Acção anti-neoplásica**

As células da linha monócitária/macrofágica têm a capacidade de destruir selectivamente as células tumorais, quando activados por linfocinas como o interferão  $\gamma$  (Schreiber, Pace, Russel, Altman & Katz, 1983), bactérias e produtos bacterianos (Chedid, Carelli & Audibert, 1979), ou LPS (Doe & Henson, 1978). A activação dos macrófagos é bastante mais eficiente quando induzida por linfocinas ou por produtos bacterianos libertados por lipossomas do que quando

activados pelas mesmas substâncias na sua forma livre (Fidler, 1980). Deodhar et al (1982) demonstraram que a PCR, encapsulada em lipossomas, tem capacidade de reduzir a invasão metastática nos ratos com diferentes tipos de tumores (Deodhar, James, Chiang, Edinger & Barna, 1982). *In vitro* os lipossomas, contendo PCR, mostram também ter a capacidade de estimular a actividade anti-tumoral, mediada pelos macrófagos (Barna, Deodhar, Gautam, Yen-Lieberman & Roberts, 1984). Demonstrou-se, ainda, que a PCR, na sua forma livre, é capaz de activar os macrófagos e induzir a sua capacidade anti-tumoral sem que esta implique a mediação por linfocinas ou LPS (Zahedi & Mortensen, 1986).

## **2.5 Quantificação das concentrações da PCR**

No Homem, a quantificação das concentrações séricas da PCR tornou-se num importante meio, a partir do qual não só se obtêm informações que permitem chegar a um diagnóstico de forma mais fácil, como também facilita o estabelecimento de um prognóstico e permite avaliar a resposta a um tratamento (Gabay & Kushner, 1999; Pepys & Baltz, 1983).

Em animais, as investigações realizadas nas duas últimas décadas confirmaram que a quantificação das concentrações das APPs em circulação, permitem identificar a presença de inflamação ou infecção (Eckersall, 2000). Em estudos experimentais e no diagnóstico de doenças, na espécie canina, a PCR foi considerada a principal proteína de fase aguda, aumentando rapidamente e de forma pronunciada em resposta à infecção ou lesão tecidual, o que fez com que tivesse recebido, a partir daqui, especial atenção (Eckersall, Conner & Harvie, 1991).

Para que a PCR possa ser quantificada, é necessário obter uma amostra de sangue periférico, de forma asséptica, por punção venosa (veia jugular, cefálica ou ilíaca). Apesar de esta constituir a amostra mais frequente em Medicina Veterinária para a quantificação das concentrações de PCR, foram descritas em diversos estudos outras possibilidades tais como: saliva (Parra, Tecles, Martínez-Subiela & Ceron, 2005), líquido bronco-alveolar (Casals et al., 1998), líquido sinovial (Hurter et al., 2005) e diferentes tipos de derrames (Parra, Papasouliotis & Ceron 2006a).

Uma vez recolhida, a amostra de sangue deve ser colocada num tubo seco, uma vez que a presença de anticoagulante poderá alterar as suas concentrações. O sangue deverá ser imediatamente centrifugado, estando descrito a possibilidade de, por 24 horas, ser refrigerado (2°C a 8°C). Uma vez centrifugado, existem três possibilidades: ou se procede, desde logo, à quantificação da PCR, ou refrigera-se (2°C a 8°C) o soro obtido por um período máximo de 24 horas, ou congela-se a uma temperatura de -20°C, estando descrito que, mesmo por períodos superiores a três meses, não há perda de PCR (“Phase<sup>TM</sup> Range – Canine C-Reactive Protein

Assay”). Os soros lipémicos, hemolisados ou ictericos deverão ser rejeitados, uma vez que a sua presença poderá implicar alterações nos valores reais de PCR (“Phase™ Range – Canine C-Reactive Protein Assay”).

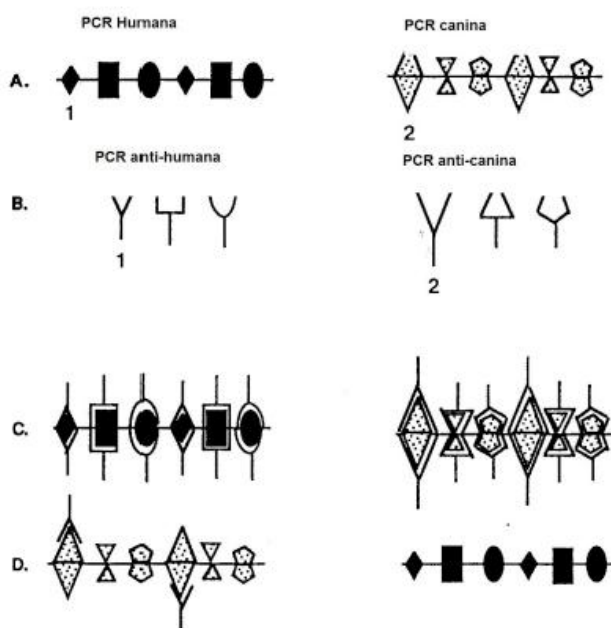
A quantificação das concentrações da PCR canina (PCR-c) baseia-se na utilização de testes imunológicos, sendo que os mais utilizados em Medicina Veterinária são: electro-imuno-ensaio (Caspi et al., 1987), imunodifusão (Conner et al., 1988a; Yamamoto et al., 1992), ELISA – “enzyme-linked immunoabsorbent assay” (Eckersall, Conner & Parton, 1989; Ndung’u, Eckersall & Jennings, 1991; Yamamoto et al., 1992), imunoturbidimetria (Eckersall et al., 1991), CRPLA – “capillary reversed passive latex agglutination” (Tagata et al., 1996), imunocromatografia (McGrotty, McComb, Ramsey & Eckersall, 2001). Para que os resultados sejam fidedignos, devem-se utilizar sempre os Kits Comerciais desenvolvidos especificamente para esta espécie.

### **2.5.1 Reacções cruzadas entre a PCR canina e a PCR humana**

Em 1993, Yamamoto e seus colaboradores estudaram a possibilidade de ocorrerem reacções cruzadas entre a Proteína C Reactiva canina e a PCR humana. Com este intuito, foram produzidos anti-soros para a PCR-c. Para tal, recolheram-se soros de 5 cães que apresentavam um processo inflamatório e, posteriormente, foram inoculados em quatro cabras e trinta coelhos. Por imuno-electroforese, verificou-se que todos os anti-soros reagiram com a PCR-c, mas não reagiram com a Proteína C Reactiva humana, excepto nos casos em que as concentrações de PCR se encontravam  $\geq 150$  µg/ml, facto explicado pela similaridade de alguns epitopos em ambas as moléculas. Esta observação permitiu concluir que embora possa ocorrer, nos casos em que as concentrações de antigénios e anticorpos são muito elevadas, uma reacção entre a PCR-c e anti-corpos anti-Proteína C Reactiva humana (Fujise et al., 1992), os testes comerciais humanos não devem ser utilizados para amostras caninas (Yamamoto et al., 1993a), devendo-se utilizar anticorpos específicos de modo a obter resultados fidedignos (Maudsley & Pepys, 1987 citado por Archer, 2008) (Figura 16).



**Figura 16. Representação esquemática da reacção antigénica cruzada entre anticorpos anti-PCR humana e PCR canina.** (Yamamoto et al., 1993a).



A: determinantes antigénicos nas moléculas da PCR humana e canina; B: anticorpos anti-PCR humana e anti-PCR canina; C, reacção entre os anticorpos anti-PCR humana (B1) e PCR humana (epítipo A1) e entre os anticorpos anti-PCR canina (B2) e a PCR canina (epítipo A2); D, reacção cruzada dos anticorpos anti-PCR humana (B1) com a PCR canina (epítipo A2) e inexistência de reacção cruzada dos anticorpos anti-PCR canina (B2) com a PCR humana (epítipo A1).

Este esquema sugere que, a reacção cruzada entre os anticorpos B1 anti-epítipo A1 presente na molécula da PCR humana têm capacidade de reagir com o epítipo A2 da molécula da PCR canina. Contudo o anticorpo B2 anti-epítipo A2 não reage com o epítipo A1 na molécula da PCR humana, uma vez que é estruturalmente largo de mais para conseguir ligar-se a A1.

## 2.5.2 Imunodifusão

A imunodifusão é uma técnica imunológica em que os complexos Ag-Ac precipitam em agar gel. De entre as várias provas possíveis, destaca-se para a detecção de PCR, a imunodifusão radial. A sua realização caracteriza-se por colocar a amostra num pocinho do agar. Se esta contiver o antígeno que se pretende pesquisar, o mesmo precipitará com o anticorpo específico já incorporado no agar. Ao ocorrer precipitação, formar-se-á um halo em torno do pocinho. O diâmetro do halo é proporcional à concentração da PCR presente na amostra (Gamazo, López-Goñi & Díaz, 2005).

## 2.5.3 Electro-imuno-ensaio

Com maior sensibilidade e rapidez comparativamente à imunodifusão, o electro-imuno-ensaio baseia-se no mesmo princípio. A diferença consiste no facto da migração de antígenos ser conduzida por um potencial eléctrico. Neste caso, a precipitação dos complexos imunes é

visível pela formação de uma linha, cujo comprimento é directamente proporcional à concentração de PCR presente na amostra (Gamazo, López-Goñi & Díaz, 2005).

#### **2.5.4 “Enzyme-Linked Immunoabsorbentassay” (ELISA)**

Para a detecção da PCR através de ELISA, utiliza-se o método sandwich, um método quantitativo que apresenta como principal desvantagem a sua complexidade (Eckersall et al., 1989).

Este teste baseia-se na utilização de uma microplaca de poliestireno, contendo poços que previamente, são revestidos por anticorpos anti-PCR canina. É no interior dos referidos poços que colocamos o soro onde possivelmente se encontra o nosso antigénio. Uma vez presente o antigénio é capturado e liga-se ao anticorpo. Procede-se, então, a uma primeira lavagem, que permite a eliminação de antigénios livres. Nesta fase, adiciona-se um segundo anticorpo anti-PCR que se encontra acoplado a uma enzima e que se ligará ao primeiro imuno-complexo. É feita uma segunda lavagem. Finalmente, adiciona-se o substrato cromogénico, que por acção da enzima, vai sofrer alterações na sua coloração. A reacção é interrompida pela adição de uma solução STOP. A quantificação da Proteína C Reactiva é feita por leitura da densidade óptica num espectrofotómetro (450 nm). Está descrita a possibilidade das concentrações da PCR quantificadas por este método, serem afectadas pela presença de um soro hemolisado, lipémico ou ictérico (“A double antibody sandwich enzyme immunoassay for C-reactive protein Kalon Biological Ltd”).

#### **2.5.5 Imunoturbidimetria**

Foi no seguimento da necessidade de um método simples, rápido, mas sensível, para quantificar as concentrações da PCR no cão que surgiu a imunoturbidimetria (Yamamoto et al., 1994b). Este método permite a detecção da PCR a partir de concentrações de 1 µg/ml, contudo requer instrumentos especializados e os seus resultados são afectados pela hemólise do soro (Tagata et al., 1996).

O princípio deste teste baseia-se na adição de anticorpos anti-PCR ao nosso soro de modo a formar complexos imunes. Por sua vez, a formação dos complexos é avaliada num espectrofotómetro a 340 nm, a cada 25 segundos, durante quatro minutos e meio. A turvação produzida, decorrente da precipitação dos já referidos complexos, é proporcional à concentração da PCR presente no soro, o que permite a obtenção de uma curva padrão com as concentrações da PCR (Rogowski et al., 2005 citado por Archer, 2008).

### **2.5.6 “Capillary Reversed Passive Latex Agglutination” (CRPLA)**

“Capillary reversed passive latex agglutination” é um método quantitativo que se caracteriza por uma utilização fácil, rápida e que não exige instrumentos sofisticados (Tagata et al., 1996), permitindo quantificar níveis de PCR compreendidas entre 6,9 µg/ml a 222 µg/ml. Desta forma, a sua utilização não permite detectar níveis de PCR fisiológicos, usualmente <6 µg/ml (Otabe et al., 1998), pelo que a sua utilização é recomendada apenas para detectar níveis aumentados da PCR.

Este método baseia-se na utilização de microesferas de látex (diâmetro de 0,12 µm) revestidas por anticorpos anti-PCR canina (IgG de coelho anti-PCR canina). Após a adição do soro canino, previamente diluído, as microesferas são colocadas no interior de um tubo capilar (diâmetro 1 mm e altura 75 mm) que posteriormente é centrifugado (2 minutos). A altura da coluna de látex precipitado no interior do tubo, permite traçar uma curva de calibração e determinar a concentração da PCR (Tagata et al., 1996).

### **2.5.7 Imunocromatografia**

Para realizar este método rápido e qualitativo é necessário: (1) diluir uma gota de soro num mililitro da solução tampão fornecida e homogeneizar cuidadosamente a mistura, (2) colocar uma gota da mistura seguida de 3 gotas de solução tampão na área reservada para a amostra, (3) esperar 5 minutos e interpretar os resultados obtidos. O resultado positivo, indicado pelo aparecimento de uma banda de teste com um azul de igual intensidade à banda controlo, corresponde a concentrações de PCR superiores a 5 µg/ml. O aparecimento de uma banda de teste azul, mas menos intensa que a banda controlo, é indicativo de um resultado fraco positivo e de concentrações de PCR compreendidas entre os 3 e os 5 µg/ml. Se não aparecer na zona de teste qualquer banda, então o resultado é negativo e as concentrações de PCR na amostra inferiores a 3 µg/ml. Referida como limitação, é a dificuldade em discernir concentrações de PCR correspondentes ao resultado negativo e fraco positivo (McGrotty, Knottenbelt, Ramsey, Reid & Eckersall, 2004).

## **2.6 Alterações biológicas da Proteína C Reactiva**

### **2.6.1 Níveis fisiológicos da PCR**

Os níveis fisiológicos da PCR, geralmente  $< 6 \mu\text{g/ml}$  (Otabe et al., 1998), foram avaliados e estudados por vários autores.

Dependendo do método utilizado para a determinação das concentrações séricas de PCR, observaram-se pequenas variações ( $8,43 \mu\text{g/ml}$ ,  $8,52 \mu\text{g/ml}$ , utilizando, respectivamente, o método ELISA e RPLA) (Yamamoto et al., 1993b). Nos vários estudos, foram propostas e avaliadas possíveis variáveis que poderiam, por si só, explicar pequenas oscilações entre indivíduos diferentes, quando utilizado um determinado método.

Concluindo, para além das variáveis fisiológicas que os vários estudos demonstraram influenciar as concentrações da referida proteína, é importante sempre saber quais os valores de referência específicos do teste que estamos a utilizar.

### **2.6.2 Alterações fisiológicas da PCR (gestação e factores ambientais)**

#### **2.6.2.1 Idade**

A influência da idade nas concentrações da PCR foi avaliada em cães saudáveis, quer mantidos em casas privadas (Yamamoto et al., 1994a), quer em ambiente controlado (Kuribayashi et al., 2003). Os resultados demonstraram a inexistência de variações significativas nas concentrações desta proteína (Kuribayashi et al., 2003; Yamamoto et al., 1994a). Contudo, Hayashi et al (2001) observaram que após indução de inflamação por inoculação de óleo de terebentina, as concentrações máximas da PCR não se revelarem significativamente diferentes entre os grupos de cães com 3 e 18 meses de idade, no entanto, diferenças significativas foram encontradas entre estes e o grupo constituído por cães com um mês de idade, no qual as concentrações registadas foram significativamente inferiores (Hayashi et al., 2001).

#### **2.6.2.2 Género**

Com o objectivo de definir as concentrações fisiológicas da PCR, Kuribayashi et al (2003) quantificaram as mesmas em 144 cães (70 machos e 74 fêmeas), da raça Beagle, mantidos em ambiente controlado. A concentração média, quantificada pelo método ELISA no género masculino foi de  $7,9 \mu\text{g/ml}$  e nas fêmeas de  $8,3 \mu\text{g/ml}$  (Kuribayashi et al., 2003). Estes valores para além de estarem em conformidade com estudos anteriores, no que diz respeito aos níveis fisiológicos da PCR em cães saudáveis mantidos quer em casas particulares quer em canis de

criadores (Yamamoto et al., 1994a), permitiram concluir que não existem diferenças significativas nas concentrações da PCR entre machos e fêmeas (Kuribayashi et al., 2003).

### **2.6.2.3 Ritmo circadiano**

Até 1998, pouco se sabia se as concentrações da PCR variavam ou não longo do dia ou ao longo do mês. Até à data, existiam apenas relatos escassos indicativos que durante as 24 horas de um dia não se verificam alterações significativas nas concentrações plasmáticas da PCR (Sitton, Taggart, Dixon, Surrall & Bird, 1984; Bruguerolle et al., 1986), mas que, ao longo de vários dias, poder-se-iam verificar alterações significativas nos níveis desta proteína, tendo sido atribuído ao frio ou à fadiga a razão daquelas alterações (Yamagishi et al., 1989).

Otabe e seus colaboradores (1998) realizaram um estudo em 10 cães saudáveis (5 fêmeas e 5 machos) da raça Beagle, mantidos em ambiente controlado com o objectivo de avaliar possíveis variações das concentrações da PCR, ao longo de 24 horas e/ou de 4 semanas. Para tal, recolheram 7 amostras com um intervalo de 3 horas durante 24 horas e duas amostras por dia, três vezes por semana, durante 4 semanas. Concluíram então, que não existiam quaisquer alterações significativas nas concentrações da PCR, quer ao longo dum dia, quer ao longo dum mês (Otabe et al., 1998).

### **2.6.2.4 Gestação**

Com o objectivo de determinar as concentrações da PCR durante a gestação Otabe et al. (1998) utilizaram 8 Beagles gestantes, nos quais quantificaram as concentrações da PCR com intervalos de 15 dias, ao longo de todo o período de gravidez. Os seus resultados demonstraram que as concentrações desta proteína aumentaram, atingindo valores de 70,2 µg/ml a 90,4 µg/ml entre o dia 30 e o dia 45, após ovulação (Otabe et al., 1998). Apesar de desconhecido o mecanismo exacto que conduz a este aumento, os autores deste estudo apontaram como possível causa a influência de factores endócrinas, que já previamente se sabia afectarem a produção das proteínas de fase aguda (Routledge, 1986). Eckersall et al. demonstraram, ainda, que no período pós parto, a PCR volta a aumentar (Eckersall et al., 1993), facto que só se verificou num dos oito cães utilizados no estudo realizado por Otabe e seus colaboradores (1998).

### **2.6.2.5 Factores ambientais**

Yamamoto et al (1994a), ao quantificarem as concentrações da PCR através dos métodos RPLA e ELISA (8,5 +/- 6,3 µg/ml e 8,4 +/- 4,9 µg/ml respectivamente) em cães saudáveis, observaram que a média das concentrações obtidas se revelaram superiores às anteriormente

observadas em Beagles mantidos em ambiente controlado (Yamamoto et al., 1992). Concluíram, então, que esta diferença se devia ao facto de que, neste último estudo, os animais em questão foram mantidos em casas privadas, o que os terá exposto a factores ambientais que terão estimulado o seu sistema imunitário e que consequentemente provocaram um acréscimo nas concentrações da Proteína C Reactiva (Yamamoto et al., 1994a).

### **2.6.3 Alterações patológicas da PCR**

Como já foi dito anteriormente, as concentrações sanguíneas da PCR aumentam entre 100 a 1000 vezes em 24 a 48 horas, após o início da inflamação. Este facto levou a que, em Medicina Humana, esta proteína fosse utilizada como um marcador sensível de inflamação. Similarmente à resposta que ocorre nos humanos, também é sabido que, no cão, as concentrações de PCR se encontram elevadas em várias situações. Descritas por vários estudos, estas situações incluem: inflamação; doenças infecciosas tais como, Leptospirose, Babesiose, Parvovirose (Ceron, Eckersall & Martynezi-Subiela, 2005); trauma cirúrgico (Conner et al., 1998a); neoplasias malignas como o linfoma, hemangiossarcoma (Mischke, Warterston & Eckersall, 2006; Tecles, Spiranelli, Bonfanti, Ceron & Paltrinieri, 2005) e tumores cólon rectais (Mazhar & Ngan, 2006); piómetra (Fransson et al., 2004); pancreatite aguda (Holm, Rozanski, Freeman & Webster, 2004); anemia hemolítica imunomediada; artrite e glomerulonefrite (Onishi et al., 2000).

Contudo, em Medicina Veterinária, os níveis de PCR não são utilizados como testes de rotina e até então a sua relevância em clínica permanece desconhecida (Nakamura et al., 2008).

A fim de investigar a utilidade clínica da determinação da Proteína C Reactiva nos cães, Nakamura et al. (2008) mediram a sua concentração através do método nefelométrico em 928 cães com várias doenças. Em todos os casos de piómetra, paniculite, pancreatite aguda, poliartrite e hemangiossarcoma, as concentrações de PCR encontravam-se significativamente elevadas. Por outro lado, em alguns casos de doenças neurológicas tais como: epilepsia, meningoencefalite e hidrocefalo, assim como nas seguintes doenças endócrinas: hipotireoidismo, hiperadrenocorticism e diabetes mellitus, as concentrações de PCR estavam apenas elevadas. Apesar do seu acréscimo em muitas doenças, verificou-se também que os maiores valores de PCR, bem como a extensão dessa mesma elevação, estavam associados a doenças neoplásicas e imuno-mediadas (Nakamura et al., 2008).

### **2.6.3.1 PCR em pacientes com lesão/inflamação aguda da mucosa gástrica**

Através da administração de uma dose única, por via oral, de ácido acetilsalicílico (200mg/kg) ou indometacina (60 mg/kg) ou cloreto de sódio (1g/kg), foi induzida em cães uma lesão aguda da mucosa gástrica e posteriormente monitorizadas as concentrações séricas da PCR.

Independentemente do composto utilizado, as variações nas concentrações da PCR reflectiram quer a progressão, quer a regressão das lesões induzidas na mucosa gástrica que foram observadas por endoscopia.

Otobe K. et al. (2000) concluíram que, a obtenção de um diagnóstico seguro e o seguimento de lesões gastrointestinais, poderão ser melhorados, em Medicina Veterinária, pela quantificação das concentrações da PCR (Otobe, Ito, Sugimoto & Yamamoto, 2000).

De acordo com as conclusões acima descritas, um outro estudo realizado por Hayashi et al., demonstrou que as concentrações de PCR aumentam 24 horas após a inoculação de óleo de terebentina (1ml/10 kg, I.M.) em cães com idades compreendidas entre os 3 e os 18 meses (Hayashi et al., 2001), comprovando assim que a presença de inflamação conduz à síntese de PCR.

### **2.6.3.2 PCR em pacientes com infecções bacterianas, virais e parasitárias**

Com o objectivo de verificar a resposta da PCR perante infecções bacterianas e virais, foi realizado um estudo em macacos (*Macaca irus*), no qual se quantificaram as concentrações desta proteína em animais saudáveis, animais inoculados com *Bordetella bronchiseptica* e animais inoculados com o vírus do sarampo (Jinbo et al., 1999).

Os seus resultados demonstraram que as concentrações da referida proteína, aumentaram de forma marcada no soro dos macacos inoculados com *Bordetella bronchiseptica*, tal como aconteceu anteriormente quando se inoculou esta mesma bactéria em cães (Yamamoto et al., 1994a). Em simultâneo, os resultados daquele mesmo estudo, permitiram concluir que a avaliação da PCR é mais eficaz comparativamente à contagem de leucócitos na monitorização da infecção aguda provocada por este agente (Jinbo et al., 1999).

Em relação ao grupo de macacos no qual se inoculou o vírus do sarampo, verificou-se que as concentrações da Proteína C Reactiva não sofreram qualquer alteração, ao contrário da contagem total de leucócitos, na qual se verificou um acréscimo relativamente aos seus valores de referência (Jinbo et al., 1999).

Com este estudo, observou-se que o acréscimo na contagem total de leucócitos ocorre um a dois dias após a inoculação de qualquer um dos dois agentes e que este meio não permite por si só diferenciar infecções bacterianas de virais. Contudo, se associarmos a contagem total de leucócitos à quantificação das concentrações da PCR, podemos concluir se a etiologia da

infecção é bacteriana ou viral (Jinbo et al., 1999). Em Medicina Humana, alguns autores defendem que a quantificação da PCR permite distinguir infecções bacterianas de infecções virais. Por exemplo, as meningites bacterianas, resultam num acréscimo significativo das concentrações da PCR, enquanto que nas meningites virais, não se observam quaisquer alterações (Peltola & Rasanen, 1982). A quantificação dos níveis de PCR revelou-se também útil na distinção de pneumonias virais de bacterianas (Mizuhara et al., 1994).

Shimada e os seus colaboradores (2002) verificaram que após inoculação de *Ehrlichia canis*, uma bactéria intracelular obrigatória, em 20 cães da raça Beagle, as concentrações séricas da PCR aumentaram, o que já se tinha observado anteriormente (Rikihisa et al., 1994). A hipertrofia das células de Kuppfer, a hiperplasia hepática e o aumento da actividade de enzimas específicas do fígado, como a alanina transaminase (ALT) e a fosfatase alcalina (FA), foram observadas em cães como uma resposta de fase aguda, induzida experimentalmente pela ehrlichiose (Dillman & Coles, 1966; Reardon & Pierce, 1981; Walker et al., 1970). Uma actividade aumentada destas enzimas foi observada no soro de aproximadamente  $\frac{1}{3}$  dos cães naturalmente infectados e com leves sinais da doença (Kuehn & Gaunt, 1985; Troy & Forrester, 1990). Este aumento na concentração das referidas enzimas, em cães infectados por *E. canis*, pode estar relacionado com um aumento da síntese de PCR no fígado, o que explica o aumento das suas concentrações plasmáticas nos cães infectados, tendo já Caspi et al. (1987) demonstrado uma correlação entre as concentrações da fosfatase alcalina sérica e os níveis de PCR (Caspi et al., 1987).

As concentrações máximas alcançadas neste estudo foram superiores a 200 µg/ml (217 µg/ml a 788,8 µg/ml) (Shimada et al., 2002), no entanto, sensivelmente inferiores às verificadas por Yamamoto et al após inoculação de *Bordetella bronchiseptica* (Yamamoto et al., 1994a). A interpretação dos resultados permitiu concluir que, para além das concentrações máximas da PCR serem mais baixas, a cinética da resposta da mesma proteína é mais lenta, uma vez que após inoculação de *E. canis* e *B. bronchiseptica*, as concentrações máximas foram alcançadas entre o 15º e 42º dia e entre o 1º e o 2º dia, respectivamente. Similarmente, num outro estudo onde foi inoculado, em cães, um parasita intracelular facultativo, *Trypanosoma brucei*, verificou-se que as concentrações da Proteína C Reactiva começaram apenas a aumentar a partir do 10º dia após a sua inoculação (Ndung'u et al., 1991). A explicação atribuída para esta diferença, é o facto de microrganismos intracelulares, o caso quer de *E. canis*, quer de *T. brucei*, apresentarem uma multiplicação mais lenta e serem, portanto, responsáveis por uma lesão menos grave e mais tardia a nível tecidual e, consequentemente, uma resposta de fase aguda significativamente mais moderada (Rikihisa et al., 1994).



Outro aspecto importante é o facto de, nos cães infectados por *T. brucei*, as concentrações de PCR se manterem altas, enquanto o parasita persiste no organismo e, uma vez eliminado, após um tratamento adequado, as concentrações baixarem, voltando aos seus valores normais (Ndung'u et al., 1991). Este facto permitiu concluir que a quantificação da PCR pode ajudar, de forma significativa, na avaliação do curso da doença, na eficácia do tratamento, na obtenção de um prognóstico e no diagnóstico de recidivas (Ndung'u et al., 1991). Contudo, em cães infectados por *E. canis*, apesar da persistência do microrganismo no sangue, as concentrações de PCR baixam e os sinais clínicos cessam, o que sugere a existência de uma auto-reparação da lesão inicialmente causada por *E. canis* ou a indução de um mecanismo compensatório. Neste caso concreto, a PCR não pode ser utilizada como indicador de uma eficaz eliminação do agente patogénico (Rikihisa et al., 1994).

Matijatko et al (2007) verificaram que, em cães com babesiose, as concentrações da PCR se encontram aumentadas cerca de 800 vezes relativamente aos seus valores normais, e que as mesmas começam a baixar entre o 1º e o 8º dia, após iniciado o tratamento, alcançando, no último dia, as suas concentrações fisiológicas. Estas observações permitiram que Matijatko e os seus colegas (2007) defendessem a utilidade da quantificação da PCR na monitorização da eficácia do tratamento em cães infectados por *Babesia canis*. Uma vez comparada a outros parâmetros, como a contagem de leucócitos e a velocidade de sedimentação dos eritrócitos (VHS), utilizados rotineiramente como marcadores da fase aguda de infecção, a quantificação das concentrações da PCR mostrou uma maior sensibilidade. Contudo, este acréscimo na concentração da PCR verificou-se igualmente em múltiplas outras situações, o que torna a sua especificidade baixa e talvez limite a sua utilização futura no diagnóstico de babesiose (Matijatko et al., 2007).

Sasenelli et al (2007) estudaram a cinética da PCR durante o tratamento com alopurinol, em cães infectados por *Leishmania infantum*, tendo demonstrado que as concentrações desta mesma proteína apresentam alterações. A interpretação destas, permitiu concluir que a mesma proteína pode constituir um marcador adicional e válido a partir do qual se obtém a informação necessária que permite aferir o momento ideal para cessar a terapêutica. Também neste estudo, a quantificação da PCR permitiu a monitorização pós terapêutica e o diagnóstico de recidivas (Sasenelli et al., 2007).

### **2.6.3.3 PCR após cirurgia**

Tal como já mencionado, os níveis séricos da PCR aumentam de forma rápida e significativa após um estímulo agudo, resultado de uma resposta de fase aguda que, no caso concreto do cão, ocorre mais rapidamente que na espécie humana. Verificou-se, que de todas as proteínas

de fase aguda, a PCR é aquela que responde de forma mais rápida após cirurgia, apresentando, no cão, um acréscimo bastante significativo (Conner et al., 1988a).

Com o objectivo de testarem estas conclusões, Yamamoto et al (1993b) quantificaram os níveis da PCR em 29 cães sujeitos a vários tipos de cirurgia: OVH devido a piómetra ( $n=3$ ), OVH convencional ( $n=3$ ), cirurgia ortopédica ( $n=4$ ), remoção de dentes ( $n=4$ ) e excisão superficial de tumores ( $n=15$ ) e em três tempos distintos, pré cirúrgico (T0), pós cirúrgico (T1) e 8 dias após a cirurgia, aquando da remoção das suturas (T2) (Tabela 5) (Yamamoto et al., 1993b).

**Tabela 16. Tabela resumo do estudo realizado por Yamamoto et al., 1993b**

| <b>CIRURGIA</b>                        | <b>PCR (<math>\mu\text{g/ml}</math>) em T0</b> | <b>PCR (<math>\mu\text{g/ml}</math>) em T1</b> | <b>PCR (<math>\mu\text{g/ml}</math>) em T2</b> |
|--|--|--|--|
| <i>OVH devido a piómetra</i>           | 61,4   | 181,6  | 19,1   |
| <i>OVH convencional</i>                | 11,7   | 136,2  | 36,0   |
| <i>Cirurgia ortopédica</i>             | 47,6   | 383,2  | 72,3   |
| <i>Extracção dentária</i>              | 30,5   | 61,2   | 72,5   |
| <i>Excisão de tumores superficiais</i> | 78,5   | 249,2  | 39,8   |

Os seus resultados demonstraram que:

- (1) em todos os grupos, à excepção do grupo submetido a OVH convencional, os níveis séricos da PCR em T0 encontravam-se acima dos valores considerados normais (8,43  $\mu\text{g/ml}$  através do método ELISA e 8,52  $\mu\text{g/ml}$  através de RPLA);
- (2) em todos os grupos, à excepção dos cães submetidos à extracção dentária, os níveis séricos da PCR atingiram os valores máximos entre as 24 e as 48 horas após cirurgia;
- (3) aquando da remoção das suturas, os níveis séricos da PCR revelaram-se significativamente mais baixos (Yamamoto et al., 1993b).

É importante termos presente que o tipo de intervenção cirúrgica reflecte a gravidade e a extensão das lesões tecidulares (Caspi et al., 1984) e que um acréscimo superior das concentrações de PCR resulta de uma maior manipulação dos tecidos com destaque para a manipulação de tecidos musculares e/ou da medula óssea (Yamamoto et al., 1993b). Desta forma, e tal como esperado, as concentrações mais elevadas da PCR foram verificadas em pacientes submetidos a cirurgia ortopédica.

Concluindo, as concentrações da PCR no sangue aumentam rápida e marcadamente após cirurgia, e voltam a decrescer à medida que os sinais clínicos cessam, atingindo valores significativamente mais baixos na altura em que a sutura é removida. No entanto, quaisquer complicações que surjam tais como, infecção da zona de sutura ou deiscência da mesma, traduzem-se por uma manutenção ou mesmo elevação das concentrações séricas da PCR (Knapp, Schrod, Grevel & Ochtering, 2001).

#### **2.6.3.4 PCR em doenças neoplásicas**

Em pacientes oncológicos, as concentrações da Proteína C Reactiva encontram-se aumentadas, particularmente nos casos de tumores hematopoiéticos, como o linfoma e a leucemia (Tecles et al., 2005) e exceptuando-se alguns tumores localizados, como o leiomiossarcoma (Nakamura et al., 2008). Em humanos, vários estudos demonstraram que, em pacientes com linfoma (Pedersen & Sørensen, 2003; Wieland et al., 2003) e leucemia (Le Coutre et al., 2002), os níveis sanguíneos da PCR estão relacionados directamente com a gravidade do tumor e/ou a presença de sinais clínicos. Em pacientes com tumores colo-rectais, verificou-se que as concentrações séricas de PCR são considerável e consistentemente mais elevadas em estádios avançados da doença (Durdey, Williams & Brown, 1984; Mercer & Talamo, 1985; Stamatides, Manouras, Triantos, Katergiannakis & Apostolidis, 1992; Nozoe, Matsumata, Kitamura & Sugimachi, 1998). Em tumores mamários, está descrito que o aumento das concentrações da PCR é maior em pacientes com lesões disseminadas comparativamente aos que apresentam lesões locais ou tumores em fase inicial (Caspi et al., 1987).

O facto dos níveis sanguíneos de PCR se relacionarem negativamente com a sobrevivência de pacientes com mieloma múltiplo, linfoma, neplasias colo-rectais (Wigmore, MacMahon, Sturgeon & Fearon, 2001) e tumores malignos pulmonares, esofágicos e pancreáticos, fez com que, em Medicina Humana, este parâmetro se tornasse útil como marcador de prognóstico (Alexandrakis et al., 2003; Falconer et al., 1995; Legouffe et al., 1998; Nozoe, Saeki & Sugimachi K., 2001; Staal-van den Brekel, Dentener, Schols, Buurman & Wouters, 1995). Em pacientes com leucemia crónica, verificou-se também a utilidade da PCR na monitorização do curso da doença, na avaliação da eficácia do tratamento, bem como no diagnóstico precoce de recidivas (Le Coutre et al., 2002), sendo que as primeira e última capacidades também se verificaram em pacientes com tumores colo-rectais (Wigmore et al., 2001).

Sabe-se que existem períodos leucopénicos associados ao tratamento quimioterápico e que estes podem culminar com o desenvolvimento de uma sepsis. Também, nestes casos, a quantificação da PCR se demonstrou útil, ao constituir um indicador precoce desta situação (Bayer, Schöntube & Dörffel, 2000).

Mischke e seus colaboradores, quantificaram os valores de PCR, utilizando o método ELISA, em cães com linfoma multicêntrico maligno ( $n=16$ ), leucemia linfoblástica aguda ( $n=11$ ), leucemia linfocítica ( $n=7$ ), mieloma múltiplo ( $n=8$ ), e num grupo de cães adultos saudáveis que constituíram o Grupo Controlo ( $n=25$ ). Verificaram que as concentrações de PCR se encontravam elevadas, em 13 dos 16 cães com linfoma maligno (37,2 mg/L), em 10 dos 11 cães com leucemia linfoblástica aguda (47,8 mg/L), em todos os cães com leucemia linfocítica

(35,5mg/L) e em 5 dos 8 cães com mieloma múltiplo (17,6 mg/L) quando comparadas com a média dos valores obtidos no Grupo Controlo (1,67 mg/L). Estes resultados demonstraram que a neoplasia linfática está associada a acréscimos significativos nas concentrações de PCR (Mischke et al., 2006) e que as suas concentrações se relacionam directamente com a gravidade do tumor.

A explicação para o aumento da PCR em indivíduos com linfoma, leucemia e mieloma foi atribuída ao facto da IL-6 estar aumentada nestes pacientes, uma vez que esta interleucina desempenha o papel central na maturação de células B normais e na patogénese de neoplasias linfáticas como o mieloma múltiplo e o linfoma maligno (Klein & Bataille, 1992; Legouffe et al., 1998). Para além disto, a reacção inflamatória associada ao próprio tumor, conduz à activação de macrófagos e consequente libertação de mais citocinas por estas células, o que também é uma forte causa do acréscimo nos valores de PCR (Ganz, Shell & Tokes, 1983).

## **2.7 Utilização da Proteína C Reactiva na prática clínica**

A análise das proteínas de fase aguda tornou-se um procedimento comum na prática clínica, sendo que a sua utilização tem como principal objectivo a detecção de doenças infecciosas (Eckersall, 2000).

Em Medicina Humana, e, cada vez mais em Medicina Veterinária, a determinação das concentrações das proteínas de fase aguda (APPs) fornece informações clínicas válidas quer da presença de doenças inflamatórias, quer de doenças infecciosas (Gruys, van Ederen, Alsemgeest, Kalsbeek & Wensing, 1993; Gruys et al., 1994; Kushner & Mackiewicz, 1987; Thompson, Milford-Ward & Whicher, 1992). As concentrações destas proteínas em circulação estão relacionadas com a gravidade das condições subjacentes e a sua quantificação constitui um verdadeiro meio de avaliação da presença e extensão da doença em questão, contudo, tal como a temperatura rectal ou a frequência cardíaca, os níveis das APPs não são adequados para o estabelecimento, por si só, de um diagnóstico definitivo (Peterson et al., 2004), uma vez que se tratam de marcadores inespecíficos de inflamação.

A primeira proteína de fase aguda a ser conhecida foi a Proteína C Reactiva, tendo, no Homem, sido comprovado que, através desta, poder-se-iam obter informações quanto à presença de lesões inflamatórias, de um prognóstico ou da eficácia de um tratamento (Pepys & Baltz, 1983), uma vez que a duração e magnitude da resposta são reflexo da gravidade da doença (Petersen et al., 2004).

Em Medicina Humana, este parâmetro tornou-se mais fiável quando comparado a outros marcadores inflamatórios como a temperatura, a contagem de glóbulos brancos, a velocidade

de sedimentação eritrócitária, etc, e as alterações nas suas concentrações plasmáticas são interpretadas de modo a avaliar certas e determinadas condições patológicas (Mallya et al., 1982; Peltola & Rasanen, 1982; Whicher, Chambers, Higginson, Nashef & Higgins, 1985 citado por Yamamoto et al., 1993b).

Foi apenas durante estas últimas duas décadas que, em Medicina Veterinária, os investigadores procuraram relacionar a presença de inflamação ou infecção com as proteínas de fase aguda, e procuraram chegar a um diagnóstico válido, através destes biomarcadores (Eckersall, 1999).

A mais óbvia indicação descrita para a utilização da Proteína C reactiva é a obtenção de um diagnóstico clínico, uma vez que a PCR constituiu um indicador da presença de doenças clínicas ou sub-clínicas, fornecendo informação adicional que, muitas das vezes, nos ajudam a aproximar ou a concluir um diagnóstico numa fase precoce, prevenindo quaisquer possíveis complicações. O uso da PCR no diagnóstico de doenças inflamatórias no cão foi confirmado por vários estudos, através da sua quantificação em animais doentes. Desta forma, a medição dos níveis plasmáticos de PCR permitiu confirmar a presença de infecções primárias ou condições inflamatórias, assim como infecções secundárias que surgiram no decorrer de uma causa primária não inflamatória (Eckersall, 1995).

Outra importante utilidade da quantificação da PCR é o diagnóstico de inflamação em animais que apresentam uma deficiente (insuficiente) resposta da medula óssea (leucemia, hipoplasia ou displasia mieloide, supressão da medula óssea secundária a agentes quimioterápicos), e em que, por esta razão, a contagem de glóbulos brancos não traduz o verdadeiro grau de destruição tecidual (Burton et al., 1994).

Adicionalmente, esta proteína permite monitorizar a eficácia de um tratamento através de determinações sequenciais, que fornecem informações acerca do curso da doença (Hirvonen, 2000). Depois da instituição da terapêutica adequada podem, segundo Póvoa (2000), surgir quatro situações específicas em relação às concentrações desta proteína: (1) descida rápida e exponencial, (2) descida lenta e insidiosa, (3) ausência de descida e (4) existência de um segundo pico. A presença de uma descida rápida e exponencial é indicativa de uma terapêutica adequada e ausência de alterações. O animal não necessita de uma monitorização contínua, sendo apenas necessário quantificar a PCR para verificar até quando se deve continuar a terapêutica. Quer na segunda, quer na terceira situação, o animal necessita de uma monitorização cuidada, uma vez que há possibilidade de o tratamento não ser o mais adequado ou de existirem outras alterações concomitantes. A quantificação da PCR deve ser regular, de forma a avaliar a evolução. Por último, quando há um segundo pico nas concentrações, deve haver uma monitorização constante do animal, com uma alteração do

tratamento e uma recolha de novos sinais para avaliar a presença de uma patologia concomitante. O prognóstico neste último caso é bastante reservado (Póvoa, 2000 citado por Archer, 2008).

Não se poderia deixar de ressaltar a necessidade de compreender a fisiopatologia da resposta inflamatória, especialmente no caso de doenças infecciosas, em que, frequentemente, os sinais clínicos de inflamação são considerados sinais de infecção, o que não é, necessariamente, verdade. Por esta razão, entender a resposta de fase aguda é importante, quer no estabelecimento do diagnóstico, quer na escolha da melhor altura para iniciar uma terapêutica antimicrobiana. Um diagnóstico preciso, e a distinção de doenças bacterianas e virais, através da quantificação da PCR, poderá permitir a redução de uma desnecessária utilização de antibióticos. Já é sabido que os antibióticos são mais eficazes durante a fase aguda de uma infecção, comparativamente à sua fase sub-clínica. Uma razão óbvia é que a resposta de fase aguda contribui para o efeito bactericida, actuando em sinergia com o antibiótico (Hirvonen, 2000).

### **2.7.1 A utilidade da PCR no diagnóstico diferencial de piómetra e hiperplasia quística do endométrio**

A quantificação plasmática da PCR e a percentagem de PMNs imaturos foram analisados em 64 cães com um diagnóstico provável de piómetra. O diagnóstico final, isto é, piómetra ou hiperplasia quística do endométrio foi determinado por histopatologia. Concluiu-se, então que, ao utilizar-se unicamente como teste a percentagem de PMNs imaturos, este método apresentava uma elevada sensibilidade (94%) no diagnóstico de piómetra, mas que esta sensibilidade poderia ser superior (97,7%) se combinássemos este teste com a quantificação plasmática da PCR. Já a especificidade alcançada por esta associação revelou-se baixa (75%) o que conduziu a alguns resultados falso-positivos (Fransson et al., 2004).

### **2.7.2 A PCR como marcador inflamatório de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SRIS)**

Em 2006 Fransson et al quantificaram as concentrações plasmáticas da Proteína C Reactiva, do TNF $\alpha$  e da IL-6 em cadelas com piómetra e com Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica. Concluíram que a PCR, independentemente da variação individual, é um bom marcador inflamatório de SRIS. Além disso, na presença de SRIS, as elevadas concentrações de Proteína C Reactiva e a elevada temperatura corporal foram indicativas de uma elevada morbidade que se reflectiu a duração da hospitalização (Fransson et al., 2006 citado por Archer, 2008).

### **2.7.3 A utilidade da Proteína C Reactiva na diferenciação dos derrames cavitários**

As concentrações da Proteína C Reactiva foram quantificadas em 50 cães com derrames em diferentes cavidades, e as mesmas classificadas como transudados, exsudados e transudados modificados de acordo com as concentrações de proteínas totais, a contagem total de células nucleadas, os achados citológicos e a sua etiologia. Posteriormente, as concentrações da PCR foram quantificadas e observaram-se diferentes valores de acordo com a classificação estabelecida previamente. As concentrações mais elevadas observaram-se nos exsudados (4,47 a 54,59 µg/ml), as mais baixas nos transudados (0,0094 a 7,87 µg/ml) e as concentrações intermédias verificaram-se nos transudados modificados (0,045 a 10,78 µg/ml). A interpretação dos resultados deste estudo demonstrou que a quantificação da PCR apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 94,4% na diferenciação entre exsudados e transudados quando o “cut-off” é de 4 µg/ml, já um “cut-off” de 11 µg/ml corresponde a uma sensibilidade de 88,2% e uma especificidade de 100% na distinção entre exsudados e transudados modificados. Contudo, uma baixa sensibilidade (80%) e a uma baixa e inaceitável especificidade (66,7%) na diferenciação entre transudados e transudados modificados verificou-se quando o “cut-off” foi de 1 µg/ml (Parra et al., 2006a).

### **3. CAPITULO III - TRABALHO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Objectivos**

O presente estudo teve como objectivo primordial a quantificação das concentrações séricas da PCR-c, em pacientes com história de trauma ( $n=12$ ), admitidos na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central, bem como a sua interpretação, tendo em conta as diferenças entre os níveis médios observados nestes pacientes e em pacientes saudáveis (Grupo Controlo, GC) ( $n=10$ ).

Pretendeu-se simultaneamente, com este estudo, relacionar os níveis séricos da PCR-c com a gravidade da lesão, reflectida na morbilidade/mortalidade do paciente em questão, tendo-se para tal estudado a correlação entre as concentrações máximas ( $\mu\text{g/ml}$ ) da PCR-c em 10 dos 12 pacientes do Grupo de Estudo (GE) e o tempo decorrido até à sua recuperação (dias).

#### **3.2 Materiais e Métodos**

##### **3.2.1 Animais envolvidos no estudo**

O presente estudo foi realizado durante um período de sete meses (Janeiro de 2009 a Julho de 2009), e nele incluídos 22 animais ( $n=22$ ) pertencentes à espécie *Canis familiaris*.

De forma a atingir os objectivos previamente propostos foram primariamente constituídos dois grupos, baseados na presença ou ausência de patologia. Surgiu assim, um grupo constituído exclusivamente por animais saudáveis (Grupo Controlo) e um outro exclusivamente constituído por animais admitidos na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central com história de trauma (Grupo de Estudo).

##### **3.2.1.1 Grupo Controlo (GC)**

Neste grupo foram incluídos dez animais ( $n=10$ ), dois dos quais (Pacientes 1 e 10) se apresentaram para vacinação em consulta no Hospital Veterinário Central e os restantes oito se encontravam alojados no “Chatuska Pet Hotel”, pertencente ao mesmo grupo do já referido Hospital.

Os critérios de inclusão foram baseados num exame físico normal e ausência de alterações/sintomatologia relevantes. Não foram excluídos animais por quaisquer motivos relacionados com raça, sexo ou idade.

Este grupo foi constituído por cinco fêmeas ( $n=5$ ) e cinco machos ( $n=5$ ), de raças variadas e com idades compreendidas entre os 3 meses e os 9 anos (Tabela 17).



**Tabela 17. Identificação de cada animal incluído no Grupo Controlo**

| NÚMERO | NOME      | RAÇA                      | SEXO      | IDADE    |
|--------|-----------|---------------------------|-----------|----------|
| 1      | Ziggy     | Boxer                     | Masculino | 8 meses  |
| 2      | Mafalda   | Labrador                  | Feminino  | 2 anos   |
| 3      | Picasso   | Golden Retriever          | Masculino | 3,5 anos |
| 4      | Matilde   | São Bernardo              | Feminino  | 7,5 anos |
| 5      | Pulguinha | Caniche x Cão Nu da China | Masculino | 9 anos   |
| 6      | Didi      | Caniche                   | Masculino | 8 anos   |
| 7      | Lua       | SRD                       | Feminino  | 3 anos   |
| 8      | Belle     | Yorkshire                 | Feminino  | 8 anos   |
| 9      | Becas     | Basset Hound              | Feminino  | 7,5 anos |
| 10     | Strong    | Pitt Bull                 | Masculino | 3 meses  |

SRD: Sem Raça Determinada

### 3.2.1.2 Grupo de Estudo (GE)

Neste grupo foram incluídos doze animais ( $n=12$ ), com história de trauma, presentes ao Serviço de Urgência e admitidos na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central. O grupo incluiu quatro fêmeas ( $n=4$ ) e oito machos ( $n=8$ ), de raças variadas e com idades compreendidas entre os três meses e os quinze anos (Tabela 18).

Os animais foram distribuídos em dois Subgrupos (I e II), consoante o número de medições das respectivas concentrações de PCR: Subgrupo I (Anexo i-Tabela 24) – pacientes com duas medições ( $n=4$ ) e Subgrupo II (Anexo i -Tabela 25) – pacientes com três medições ( $n=8$ ).

Não foram motivos de exclusão a raça, o sexo ou a idade, sendo que o único motivo se relacionou com a impossibilidade de mensuração das concentrações da Proteína C Reactiva canina (PCR-c) em mais do que um tempo.

**Tabela 18. Identificação e estímulo iatrotópico de cada animal incluído no Grupo de Estudo**

| NÚMERO | NOME     | RAÇA                            | SEXO      | IDADE    | ESTÍMULO IATROTRÓPICO          |
|--------|----------|---------------------------------|-----------|----------|--------------------------------|
| 11     | Nina     | X Caniche                       | Feminino  | 7 anos   | Trauma por mordedura           |
| 12     | Nino     | SRD*                            | Masculino | 15 anos  | Trauma por mordedura           |
| 13     | Ruca     | SRD                             | Masculino | 8 anos   | Trauma por mordedura           |
| 14     | Cherne   | SRD                             | Feminino  | 7,5 anos | Trauma por mordedura há 5 dias |
| 15     | Badochas | Labrador                        | Masculino | 3 meses  | Trauma por mordedura           |
| 16     | Kikas    | SRD                             | Feminino  | 1 ano    | Trauma por mordedura           |
| 17     | Micolli  | SRD                             | Masculino | 2 anos   | Trauma por mordedura           |
| 18     | Rex      | Pastor Alemão x Husky Siberiano | Masculino | 10 anos  | Trauma por mordedura há 5 dias |
| 19     | Sabry    | SRD                             | Masculino | 12 anos  | Trauma por mordedura           |
| 20     | Sássá    | Epanhol Breton                  | Masculino | 10 anos  | Trauma por atropelamento       |
| 21     | Ticha    | Teckel                          | Feminino  | 6 anos   | Trauma por mordedura           |
| 22     | Tita     | SRD                             | Feminino  | 10 anos  | Trauma por mordedura           |

X: cruzado / SRD: Sem Raça Determinada

### **3.2.2 Colheita de amostras**

#### **3.2.2.1 Análises Hematológicas**

Após entrada nos serviços de Hospitalização e Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central foram, por punção venosa (veia jugular), recolhidas amostras de sangue (com um volume de cerca de 3 ml), de cada animal que constituiu o GE. Estas amostras destinaram-se a Análises de Urgência (Microhematócrito, Sólidos Totais, Gasimetria, Glucose e Lactato), Hemograma (Contagem de glóbulos vermelhos, Glóbulos brancos e plaquetas) e Bioquímicas (Perfil Hepático – ALT, AST e FA e Perfil Renal – Ureia e Creatinina), utilizando para a sua mensuração os analisadores automáticos “*Rapid Point 405® – Bayer Systems Diagnostic*”, “*Glucovans Memory 2 set® – arkray 1 A menarini diagnostics*”, “*Accutrend Plus®, Ms9 vet® – melet schloesing laboratoires*” e “*Opticien 120® – coulter electronics, inc*”, respectivamente.

Apesar de, regra geral todos os animais que dão entrada nos Serviços de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central, serem submetidos às análises anteriormente referidas, por vezes, e devido exclusivamente a razões financeiras, por parte dos proprietários, é-nos impossível a realização de todas as provas, sendo que neste estudo também alguns dos animais, apenas pelo motivo já apontado, não foram sujeitos à totalidade das análises pretendidas, tendo o Médico Veterinário de serviço optado por aquelas, que em cada caso particular se revelaram estritamente essenciais.

Em anexo (*Anexo ii*) encontram-se os resultados referentes aos perfis hematológico e bioquímico para os animais do GE em que tal foi efectuado.

#### **3.2.2.2 Quantificação das concentrações da Proteína C Reactiva canina (PCR-c)**

De cada animal, quer do Grupo de Estudo, quer do Grupo Controlo, foram recolhidas amostras de sangue por punção venosa, nomeadamente na veia jugular (Imagem 3) ou cefálica (Imagem 4). Tal amostra foi recolhida por aspiração, num volume de dois mililitros, para uma seringa e desta para tubos secos, ou seja, sem qualquer tipo de anticoagulante.

No GC procedeu-se à recolha de uma única amostra de sangue após a avaliação do estado de saúde e conclusão de um exame físico normal.

No GE a colheita das amostras foi realizada em dois (T0 e T1) ou três tempos (T0, T1 e T2) diferentes:

T0: imediatamente após entrada nos Serviços de Cuidados Intensivos, ou imediatamente antes da cirurgia, nos animais submetidos à mesma;

T1: 24 após trauma, e nos animais submetidos a cirurgia, 24 horas após a mesma (à excepção do Paciente 17 que só foi possível a sua colheita 4 dias após a mesma);

T2: Durante o período de recuperação.

Todas as amostras, sem excepção, foram imediatamente direccionadas para o laboratório, onde o sangue foi centrifugado e, o soro recolhido congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação dos teores séricos da PCR-c.

---

**Imagem 3. Punção da veia jugular**



**Imagem 4. Punção da veia cefálica**



---

#### **3.2.2.2.1 Técnica para quantificação das concentrações séricas da PCR-c**

A concentração sérica da PCR-c foi determinada pelo método ELISA, utilizando a técnica “sandwich”. Foi utilizado para tal, um teste comercial – “Phase <sup>TM</sup> Range Canine C-Reactive Protein Assay – produzido por Tridelta Development Limited, Irlanda” (Anexo iii).

Este método imunoenzimático em fase sólida caracteriza-se pela utilização de uma placa com 96 poços revestida previamente por ligandos específicos para a PCR canina. De forma a quantificar as concentrações séricas da PCR-c os soros, descongelados à temperatura ambiente, foram diluídos numa solução tampão (1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000) e 100  $\mu\text{l}$  colocados em cada poço.

Durante um período de incubação de 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  a PCR uniu-se aos seus ligandos. Procedeu-se então a quatro lavagens sucessivas com “Wash Buffer” 1:20, de modo a eliminar todos os constituintes do soro que não estabeleceram ligações. De seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de uma solução que contém anticorpos anti-PCR-c, marcados com “horseradish peroxidase” (HRP).

Após incubação ( $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos) e outras quatro novas lavagens, adicionou-se o substrato (peróxido de hidrogénio) e o cromogénio (tetrametil benzidina, TMB).

A peroxidase ligada aos anticorpos anti-Proteína C reactiva canina reagiu com o peróxido de hidrogénio libertando oxigénio que oxidou a TMB, originando uma cor azulada nos poços que continham uma concentração de PCR-c detectável.

Ao adicionar uma solução para parar a reacção (ácido sulfúrico) ocorreu uma os poços antes azulados adquiriram uma coloração amarela.

Seguiu-se a leitura da absorvância através de um espectrofotómetro. A absorvância obtida permitiu então calcular a concentração da PCR-c contida no soro de cada animal através da curva de calibração previamente traçada (Gráficos 1 e 2). A curva de calibração foi traçada (de acordo com o anexo iii “Preparation of working calibration curve”) através da absorvância lida no espectrofotómetro para concentrações já conhecidas da PCR-c (Anexo iii), fornecidas juntamente com o Kit (Imagem 5).

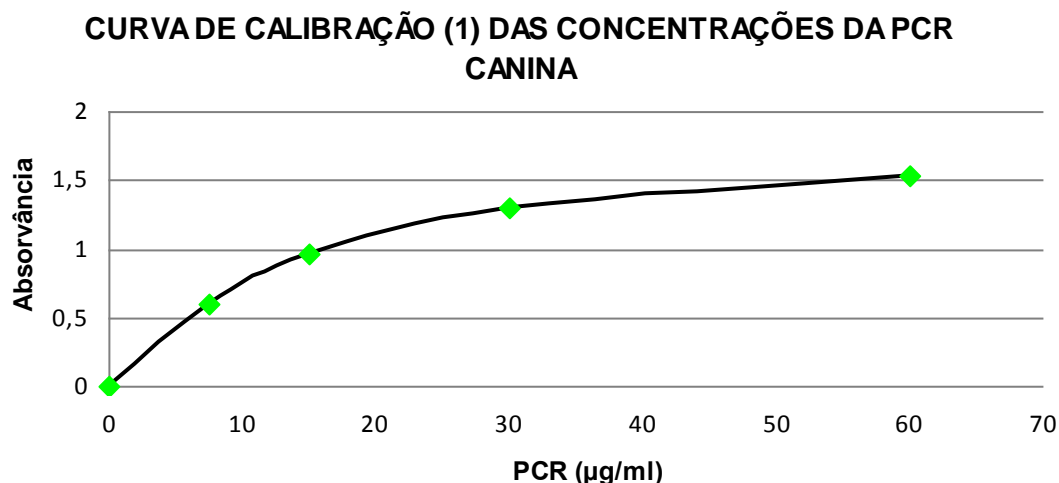
**Imagem 5. Kit para a quantificação da Proteína C reactiva canina**



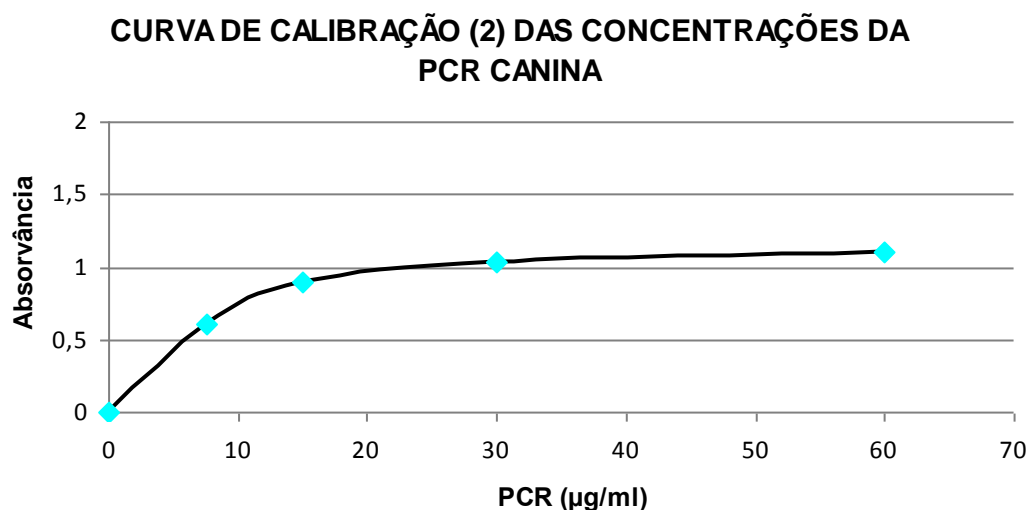
### 3.2.2.2.2 Valores de referência

De acordo com diversos estudos, e apesar de pequenas variações encontradas, consideram-se normais, isto é, sem que a eles esteja associada qualquer patologia, concentrações de PCR-c  $<6 \mu\text{g/ml}$  (Otabe et al., 1998).

**Gráfico 1. Curva de Calibração (1) para cálculo da Concentrações da PCR canina, a partir de concentrações de PCR-c previamente conhecidas**



**Gráfico 2. Curva de Calibração (2) para cálculo da Concentrações da PCR canina, a partir de concentrações de PCR-c previamente conhecidas**



### 3.2.3 Análise estatística

Os dados foram registados e introduzidos em programas informáticos para processamento estatístico. O processamento, edição, codificação e a análise estatística dos dados foram efectuados nos programas Microsoft® Excel 2003, Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Office - Microsoft Corporation®, USA) e calculadora gráfica CASIO® FX-9860G SD.

De modo a descrever e a sumariar os dados efectuou-se uma análise descritiva dos mesmos, efectuou-se a análise de variância, de modo a avaliar diferenças significativas entre a média das Concentrações da Proteína C Reactiva canina em T0 e a média das mesmas concentrações no Grupo Controlo. Foi também estudada, apenas no GE a correlação entre duas variáveis quantitativas, (1) entre os níveis máximos da concentração de PCR-c e (2) o número de dias de recuperação de cada um dos pacientes

### 3.3 Resultados

No presente trabalho foram constituídos dois grupos: Grupo Controlo (GC) e Grupo de Estudo (GE). Por sua vez, o GE foi dividido em dois subgrupos: Subgrupo I – pacientes sujeitos a duas medições, relativas às concentrações da Proteína C Reactiva canina, em dois tempos distintos (T0 e T1), e Subgrupo II – pacientes sujeitos a três medições, relativas às concentrações da mesma proteína, em três tempos distintos (T0, T1 e T2).

### 3.3.1 Grupo Controlo (GC)

Os animais incluídos, neste grupo, foram sujeitos apenas a uma medição das concentrações séricas da PCR-c apresentando-se de seguida os resultados (Tabela 19).

**Tabela 19. Concentrações séricas da PCR-c nos pacientes incluídos no GC**

| NÚMERO         | 1     | 2    | 3     | 4    | 5   | 6     | 7   | 8     | 9   | 10  |
|----------------|-------|------|-------|------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|
| PCR<br>(µg/ml) | 0,375 | 4,75 | 0,625 | 0,35 | 1,9 | 3,125 | 5,5 | 1,625 | 1,0 | 4,5 |

### 3.3.2 Grupo de Estudo (GE)

Os animais incluídos, neste grupo, foram sujeitos a duas (Subgrupo I) ou a três (Subgrupo II) medições das concentrações séricas da PCR-c.. De seguida serão apresentados então os resultados e especificados os tempos precisos das respectivas medições.

#### 3.3.2.1 Subgrupo I

Deste subgrupo fazem parte os animais incluídos no GE, nos quais foram efectuadas, duas medições das concentrações séricas da PCR-c, em T0, ou seja imediatamente antes da cirurgia a que foram sujeitos e, em T1, vinte e quatro horas após a realização da mesma.

As curvas referentes às concentrações de PCR-c de cada paciente encontram-se em anexo (Anexo iv).

**Tabela 20. Concentrações séricas da PCR-c nos pacientes incluídos no GE, pertencentes ao Subgrupo I**

| NÚMERO | PCR T0<br>(µg/ml) | PCR T1<br>(µg/ml) |
|--------|-------------------|-------------------|
| 11     | 65                | 86                |
| 12     | 9                 | 10                |
| 13     | 104               | 88                |
| 14     | 21,6              | 23,2              |

#### 3.3.2.2 Subgrupo II

Deste subgrupo fazem parte os animais incluídos no GE, nos quais foram efectuadas, três medições das concentrações séricas da PCR-c, em T0, ou seja imediatamente após entrada no Serviço de Urgências e Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central (Pacientes 15 e 22) ou imediatamente antes da cirurgia a que foram sujeitos, em T1, vinte e quatro horas após entrada (Paciente 15 e 22) ou vinte e quatro horas após a realização da cirúrgica (exceptuando o Paciente 17) e, em T2, durante o período de recuperação.

As curvas referentes às concentrações de PCR-c de cada paciente encontram-se em anexo (Anexo iv).

**Tabela 21. Concentrações séricas da PCR-c nos pacientes incluídos no GE, pertencentes ao Subgrupo II**

| NÚMERO | PCR T0<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | PCR T1<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | PCR T2<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 15     | 22,5                           | 18,25                          | 0,625                          |
| 16     | 140                            | 188                            | 240                            |
| 17     | 108                            | 13,5                           | 10,45                          |
| 18     | 23,5                           | 60                             | 26,5                           |
| 19     | 59                             | 240                            | 88                             |
| 20     | 100                            | 40                             | 188                            |
| 21     | 36,5                           | 120                            | 40                             |
| 22     | 172                            | 32                             | 21,5                           |

### 3.3.3 Avaliação das diferenças observadas entre os valores médios da PCR no GC e no GE

No que concerne à avaliação das concentrações médias entre o Grupo Controlo (2,375  $\mu\text{g/ml}$ ) e o Grupo de Estudo, no momento T0 (71,759 $\mu\text{g/ml}$ ), observaram-se diferenças altamente significativas ( $p < 0,001$ ), encontrando-se os resultados sumariados na Tabela 22.

**Tabela 22. Valores médios da PCR-c no GC e no GE**

| GRUPO | n  | $\bar{x} \pm s$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Med.<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Min.<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Max.<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-------|----|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| GC    | 10 | 2,375 $\pm$ 1,952                       | 1,763                        | 0,35                         | 5,5                          |
| GE    | 12 | 71,758 $\pm$ 52,672                     | 62                           | 9                            | 172                          |

$n$  – número de pacientes |  $\bar{x}$  – média |  $s$  – desvio padrão | Med. – mediana | Min. – Valor mínimo medido  
| Max. – Valor máximo medido

Em T1 e T2 foram encontradas, respectivamente, como concentrações médias e desvio-padrões os seguintes valores 76,579  $\pm$  73,540  $\mu\text{g/ml}$  e 76,884  $\pm$  89,660  $\mu\text{g/ml}$ . Foi verificado que todos os pacientes incluídos no GC apresentaram concentrações de PCR abaixo do limite máximo considerado normal, ou seja inferiores a 6  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 19). Quanto aos pacientes incluídos no GE, a totalidade apresentou em T0 concentrações de PCR-c (Tabelas 20 e 21) superiores às consideradas fisiológicas (6  $\mu\text{g/ml}$ ).

Em anexo (Anexo v) encontra-se o gráfico de extremos e quartis referente ao GC e ao GE, no qual se diferenciam os três tempos (T0, T1 e T2).

### 3.3.4 Estudo de correlação entre os níveis máximos da PCR de cada paciente incluído no GE e o número total de dias relativos à sua recuperação

Com este estudo pretendeu-se avaliar se as concentrações séricas da PCR-c se correlacionavam positivamente com o número de dias de recuperação de cada um dos

pacientes do GE (Tabela 23), uma vez que esta segunda variável muitas das vezes reflecte a morbilidade do paciente em questão.

Deste estudo foram excluídos os Pacientes 20 e 22, o primeiro por ter sido eutanasiado no decorrer da sua recuperação, o segundo pelo facto da totalidade do período de recuperação não ter sido acompanhada pelo corpo clínico do Hospital Veterinário Central.

Verificou-se então, que existe uma fraca correlação ( $r=0,0043$ ) entre os níveis máximos da PCR-c e o número de dias de recuperação.

**Tabela 23. Concentrações séricas da PCR-c e o número de dias de recuperação referente aos pacientes incluídos no GE**

| NÚMERO | T0 PCR<br>( $\mu\text{G/ML}$ ) | T1 PCR<br>( $\mu\text{G/ML}$ ) | T2 PCR<br>( $\mu\text{G/ML}$ ) | DURAÇÃO DA<br>RECUPERAÇÃO<br>(DIAS) | MORTE     |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| 11     | 65                             | 86                             | —                              | 12                                  | Não       |
| 12     | 9                              | 10                             | —                              | 14                                  | Não       |
| 13     | 104                            | 88                             | —                              | 11                                  | Não       |
| 14     | 21,6                           | 23,2                           | —                              | 13                                  | Não       |
| 15     | 22,5                           | 18,25                          | 0,625                          | 10                                  | Não       |
| 16     | 140                            | 188                            | 240                            | 28                                  | Não       |
| 17     | 108                            | 13,5                           | 10,45                          | 14                                  | Não       |
| 18     | 23,5                           | 60                             | 26,5                           | 68                                  | Não       |
| 19     | 59                             | 240                            | 88                             | 19                                  | Não       |
| 20     | 100                            | 40                             | 188                            | —                                   | Eutanásia |
| 21     | 36,5                           | 120                            | 40                             | 14                                  | Não       |
| 22     | 172                            | 32                             | 21,5                           | ?                                   | Não       |

### 3.4 Discussão

A resposta de fase aguda, não é mais, do que a resposta desenvolvida pelo próprio organismo perante qualquer lesão tecidular de modo a restabelecer a homeostase. Tal resposta caracteriza-se por sinais inflamatórios sistémicos, resultantes de alterações endócrinas, hematológicas, imunológicas, metabólicas e neurológicas e por uma alteração nas concentrações de algumas proteínas sintetizadas pelo fígado, denominadas proteínas de fase aguda.

Em Medicina Humana, as proteínas de fase aguda são utilizadas como parâmetros de rotina para verificar a presença de inflamação ou infecção, a evolução de uma patologia ou resposta a um determinado tratamento (Pepys, 1981).

No Homem a PCR é uma das proteínas de fase aguda cuja concentração, mensurável no soro de pacientes sujeitos a um estímulo inflamatório, pode aumentar para concentrações mil vezes superiores ou mais. Em grande parte este aumento, na sua concentração, traduz-se por um aumento da sua síntese a nível hepático (Black, 2005).



A existência da Proteína C Reactiva canina análoga à PCR humana foi confirmada em 1984 por Caspi e seus colaboradores (Caspi et al., 1984).

No presente estudo, foram recolhidas amostras sanguíneas em 22 animais da espécie *Canis familiaris*, não tendo sido motivos de exclusão quaisquer factores relacionados com a idade, sexo ou raça.

Com base na ausência ou presença de patologia surgiram primariamente dois grupos, o Grupo Controlo (GC) e o Grupo de Estudo (GE), respectivamente. No Grupo de Estudo apenas foram incluídos pacientes que tenham dado entrada nos Serviços de Urgências e na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central com história de trauma. Secundariamente procedeu-se, neste mesmo grupo, a uma subdivisão, de acordo com o número de medições das concentrações séricas da PCR canina a que foram sujeitos. Assim sendo, o GE passou a ser constituído por dois Subgrupos, Subgrupo I, onde se incluíram animais com duas medições de PCR-c, em dois tempos distintos (T0 e T1) e Subgrupo II, em que para além das duas medições já mencionadas para o Subgrupo I, foi possível efectuar uma terceira medição (T2) durante o período de recuperação destes pacientes. Para o GE, o único motivo de exclusão teve por base a impossibilidade de ser realizada mais do que uma recolha e consequente mensuração das concentrações séricas da PCR-c.

Em relação aos valores de referência a assumir e, apesar de vários estudos terem procurado chegar a estes, existem ainda certas e pequenas oscilações verificadas e justificadas, quer pela utilização de testes diferentes (Yamamoto et al., 1993b), quer por condições ambientais/acontecimentos fisiológicos diferentes. Ou seja, os valores de referência devem ter em conta quer o teste imunológico utilizado, quer as condições fisiológicas dos animais que constituem a nossa amostra, visto, que como já anteriormente referi, o stress (Yamamoto et al., 1994a) ou a gestação (Otabe et al., 1998) podem ter influencia nas concentrações da PCR, elevando-as, e sem que a essa elevação esteja obrigatoriamente associada uma patologia.

Outro aspecto a ter em conta, para que os resultados sejam fidedignos é a utilização obrigatória de Kits Comerciais desenvolvidos especificamente para a espécie canina, isto porque foi demonstrado que a antigenicidade da Proteína C Reactiva canina difere da humana (Yamamoto et al. 1993a).

O presente estudo teve como objectivo primordial a quantificação das concentrações séricas da PCR-c, em pacientes com história de trauma ( $n=12$ ), admitidos na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central, bem como a sua interpretação, tendo em conta as diferenças entre os níveis médios observados nestes pacientes e em pacientes saudáveis (GC) ( $n=10$ ). Desta primeira avaliação, foram verificadas diferenças altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre as concentrações médias da PCR-c no GC ( $2,375 \pm 1,953 \mu\text{g/ml}$ ) e a média

das concentrações da mesma proteína em T0 ( $71,758 \pm 52,672 \mu\text{g/ml}$ ) para o GE (Peterson et al., 2004). Verificou-se também que todos os animais do GC apresentavam concentrações de PCR-c inferiores ao limite máximo do valor referência e, que todos os animais pertencentes ao GE apresentavam valores de PCR-c, quer em T0, quer em T1 superiores ao mesmo valor de referência ( $< 6\mu\text{g/ml}$ ). Estes resultados vieram reforçar em primeiro lugar, que independentemente da gravidade da lesão, existe, na presença de uma condição inflamatória um acréscimo rápido e pronunciado nas concentrações séricas da PCR-c (Gabay & Kushner, 1999; Kushner & Mackiewicz, 1987) e que, em segundo lugar as concentrações da PCR-c aumentam após cirurgia (Yamamoto e tal., 1993b), uma vez que a média das concentrações em T1 ( $76,579 \pm 73,540 \mu\text{g/ml}$ ) se demonstrou igualmente elevada.

Outro aspecto que se pôde constatar é que após o início da instituição do tratamento médico-cirúrgico, isto é em T0, não ocorreu um decréscimo nas concentrações da PCR-c. Está descrito que após instituição de uma terapêutica adequada podem surgir quatro situações: (1) descida rápida e exponencial, (2) lenta e insidiosa, (3) ausência de descida e (4) existência de um segundo pico, estando as situações associadas a um prognóstico de bom a reservado, a um tratamento adequado a inadequado e a uma quantificação regular (2 e 3) a contínua (4) das concentrações séricas da PCR (Póvoa, 2000). Sabe-se também que, uma vez iniciado o estímulo inflamatório, a concentração sanguínea da PCR-c aumenta rápida e significativamente em 4 a 6 horas, sendo o seu pico alcançado entre as 24 e as 48 horas e que, após término desse mesmo estímulo, as suas concentrações decrescem rapidamente em 24 a 48 horas (Mahon & Tice 2006). Assim sendo, e no caso concreto do presente estudo, é facilmente perceptível o porquê de em T2 ( $76,884 \pm 89,660 \mu\text{g/ml}$ ) a média das concentrações da PCR-c permanecer elevada, uma vez que em quatro (Pacientes 16, 18, 19 e 21) dos oito animais em que tal medição se efectuou, esta correspondeu às 48 horas após cirurgia. Contudo enfatizo que esta interpretação não nos permite descartar outras causas que poderão estar, também na base da manutenção de valores elevados destas mesmas concentrações.

Pretendeu-se simultaneamente, com este estudo, relacionar os níveis séricos da PCR canina com a gravidade da lesão, muitas das vezes reflectida na morbilidade/mortalidade do paciente em questão. Para tal foi estudado a correlação entre as concentrações máximas ( $\mu\text{g/ml}$ ) da PCR-c em 10 dos 12 Pacientes (excluídos os Pacientes 20 e 22) do GE e o tempo decorrido até à sua recuperação (dias). A exclusão do Paciente 20 deveu-se ao facto de este ter sido eutanasiado no decorrer da sua recuperação, enquanto, que o Paciente 22 foi excluído pela sua recuperação não ter sido, na totalidade, acompanhada pelo corpo clínico do Hospital Veterinário Central. A correlação obtida revelou-se fraca ( $r=0,0043$ ), revelando-se forte,  $r=0,5384$ , ao ser excluído o Paciente 18, que apresentou um período de recuperação

excepcionalmente longo. Em T2 este paciente apresentava uma cicatrização com uma evolução positiva, no entanto, *a posteriori* a contaminação contínua do penso conduziu à infecção da sutura e consequentemente a um período de recuperação prolongado. Seria interessante, neste caso específico e, porque está descrito que a infecção da zona de sutura traduz-se pela manutenção ou mesmo pela elevação da concentração sérica da PCR (Knapp, Schrod, Grevel & Ochtering, 2001), uma quarta quantificação da mesma, contudo a proprietária não o autorizou. Uma vez excluído o Paciente 18, verificou-se que os níveis mais altos da PCR-c, quantificados nos Pacientes 16 e 19, corresponderam a períodos de recuperação mais longos (Fransson et al., 2006).

Outra situação particular que se revelou interessante foi a do Paciente 20, uma vez que foi o único em que se verificou um segundo pico nas concentrações da PCR-c (T2). Quando ocorre um segundo pico nas concentrações e, segundo Póvoa (2000) deve haver uma monitorização constante do animal, com uma alteração do tratamento e uma recolha de novos sinais para avaliar a presença de uma patologia concomitante, sendo o prognóstico neste caso reservado. Na consulta de acompanhamento em que foi realizada a recolha de uma amostra de sangue para posterior quantificação da concentração de PCR-c a proprietária decidiu a eutanásia justificada pela prostração, hiporexia e exacerbação dos problemas cardíacos que este paciente apresentava.

Em suma, a PCR-c pode ser útil na avaliação da presença, da extensão e da gravidade de processos traumáticos permitindo o diagnóstico de alterações e complicações no organismo, a avaliação da eficácia de um tratamento e o estabelecimento de um prognóstico (Matijatko et al., 2007; Peterson, Nielsen & Heegaard, 2004). Isto ocorre, não só devido ao seu aumento rápido e substancial depois de um estímulo inflamatório, como, devido ao curto tempo de semi-vida, fazendo com que as suas concentrações plasmáticas ou tecidulares diminuam rapidamente após o término desse mesmo estímulo (Chambers, Hutton, Dieppe & Witcher, 1991).

### **3.5 Perspectivas futuras**

A Investigação sobre a fisiopatologia da infecção e da inflamação em espécies animais já percorreu um longo caminho, que se estendeu desde o interesse inicialmente desenvolvido pelo aspecto fascinante do mecanismo de defesa não-específico do hospedeiro até à avaliação das concentrações séricas das APPs e o valor da sua quantificação. Nas últimas décadas, os trabalhos de investigação revelaram-nos que a quantificação da concentração destas proteínas, quer a nível plasmático, quer a nível sérico, podem providenciar informações valiosas para o diagnóstico, prognóstico e monitorização de uma doença (Eckersall, 1999;

Eckersall, 2000). No entanto, existem mais pistas de investigação que podem ser perseguidas no sentido de aprofundarmos o nosso conhecimento na resposta de fase aguda e no desenvolvimento de novas aplicações para as APPs como biomarcadores da presença de doenças animais. Há questões fundamentais por responder, como, por exemplo, as que dizem respeito à relação entre a reacção de fase aguda e os mecanismos de resposta responsáveis pelos diferentes padrões de estimulação das proteínas (Eckersall, 1999). É necessário, ainda, compreender melhor como as células comunicam umas com as outras em resposta a uma infecção viral ou bacteriana, ou ainda na presença de uma doença neoplásica, de forma a podermos interpretar e compreender as mensagens enviadas (Eckersall, 1995).

No futuro, a quantificação das APPs não se deverá restringir à sua fácil utilização no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do tratamento durante a infecção ou inflamação, sendo provável que a nossa atenção se vire para pequenas mudanças nas concentrações séricas das APPs e na utilização de um índice de fase aguda, que incorpore quer as proteínas positivas, quer as proteínas negativas de fase aguda, de modo a identificar pequenas alterações no estado clínico dos animais (Toussaint, van Ederen & Gruys, 1995).

Na prática clínica, tem-se verificado um acrescido interesse na avaliação de pequenas alterações das concentrações das APPs, após se ter descoberto que pequenos acréscimos das concentrações da PCR, anteriormente consideradas irrelevantes, estavam associadas a uma predisposição para a doença coronária cardíaca (Gabay & Kushner, 1999). Enquanto que esta patologia é de menor importância em Medicina Veterinária, a hipótese de que a Diabetes mellitus pode estar relacionado com a estimulação crónica do Sistema Imunitário, por sua vez associado a um acréscimo das proteínas de fase aguda (Pickup & Crook, 1998) tem implicações no diagnóstico e tratamento desta patologia nos cães, sendo portanto digno de uma maior investigação.

Seria interessante estudar, também, no futuro, a produção das proteínas de fase aguda em resposta a infecções causadas por diferentes estirpes de agentes patogénicos, de modo a que estas pudessem quantificar a relativa virulência dos mesmos, bem como a protecção exercida após vacinação (Eckersall, 1999).

Em clínica de pequenos animais, os avanços de futuras investigações deverão ainda estar virados para a avaliação dos efeitos da resposta de fase aguda na farmacocinética de drogas usadas em medicina veterinária, bem como a associação entre níveis sub-clínicos das proteínas e as doenças crónicas (Eckersall, 2000).

### 3.6 Conclusão

Tomando como base a experiência adquirida durante a realização deste trabalho e tendo em consideração todos os resultados obtidos, pode ser concluído o seguinte:

1. Existem diferenças altamente significativas nas concentrações séricas da PCR-c entre cães saudáveis e cães com história de trauma.
2. Após estímulo inflamatório as concentrações da PCR-c aumentaram num período de 24 a 48 horas.
3. Nos pacientes em foi possível a mensuração da PCR-c posteriormente às 24 a 48 horas após o início do estímulo inflamatório, observou-se um decréscimo nas concentrações da PCR-c.
4. O único paciente que apresentou um segundo pico nas concentrações séricas da PCR-c não apresentou uma evolução positiva no decorrer do período após alta clínica.
5. Existe uma fraca correlação entre os níveis máximos da PCR-c mensuradas e o número de dias de recuperação para os animais com história de trauma.
6. Os animais (9/12) que apresentaram os valores mais elevados de PCR-c apresentaram concomitantemente períodos de recuperação mais longos.

Em suma, as concentrações séricas da PCR têm valor em termos de diagnóstico e de prognóstico destacando-se a avaliação do grau de morbilidade do paciente em questão.

A PCR-c pode ser útil na avaliação da presença, extensão e gravidade de lesões traumáticas.

A utilização da PCR-c, como marcador inespecífico de inflamação, pode ser útil na prática clínica, ao permitir o diagnóstico de complicações, contribuindo para a prevenção da exacerbação do quadro clínico.

A PCR-c pode ser utilizada com propósitos de prognóstico, uma vez que a duração e magnitude da resposta reflectem a gravidade da doença.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. (1997). *Celular and Molecular Immunology*. (3<sup>th</sup> ed.). Wb. Saunders Company.
- Abernethy, T. J. & Avery, O. T. (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. 1. Distribution of the reactive protein in patients sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of *Pneumococcus*. *The Journal of Experimental Medicine*, 73, 173-182.
- Aderka, D., Le, J. M. & Vilcek, J. (1989). IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *The Journal of Immunology*, 143, 3517-3523.
- Agrawal, A., Samols, D. & Kushner, I. (2003). Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBP {beta} to the promoter. *Molecular Immunology*, 40(6), 373-380
- Agrawal, A., Shrive, A. K., Greenhough, T. J. & Volanakis, J. E. (2001). Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *The Journal of Immunology*, 166, 3998-4004.
- Agrawal, A., Simpson, M. J., Black, S., Carey, M. P. & Samols, D. (2002). A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide. *The Journal of Immunology*, 169, 3217-3222.
- Agrawal, A. & Volanakis, J. E. (1994). Probing the C1q-binding site on human C-reactive protein by site-directed mutagenesis. *The Journal of Immunology*, 152 (11), 5404-5410.
- Alexandrakis, M. G., Passam, F. H., Ganotakis, E. S., Sfiridaki, K., Xilouri, I., Perisinakis, K. & Kyriakou, D. S. (2003). The clinical and prognostic significance of erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum interleukin-6 (IL-6) and acute phase protein levels in multiple myeloma. *Clinical and Laboratory Haematology*, 25 (1), 41-46.
- Alsemgeest, S. P. (1994). *Blood Concentrations of Acute-Phase Proteins in Cattle as Markers for Disease*. PhD Thesis, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands.
- Alsemgeest, S. P., Kalsbeek, H. C., Wensing, T., Koeman, J. P, van Ederen, A. M. & Gruys, E. (1994). Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *Veterinary Quarterly*, 16(1), 21-23.
- Archer, C. C. (2008). *Relevância da Determinação de Proteína C Reactiva em Cirurgia – Estudo Preliminar no Cão*. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M. & Pacheco, F. C. (2007). *Fundamentos de Imunologia*. LIDEL - Edições Técnicas, Lda.
- Atkins, E. & Bodel, P. (1979). Clinical fever: its history, manifestations, and pathogenesis. *Fed. Proc.*, 38 (1), 57-63.

- Bach, R. R. (1988). Initiation of coagulation by tissue factor. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 23(4), 339-368.
- Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology*, 55, 97-179.
- Ballou, S. P. & Kushner, I. (1992). C-reactive protein and the acute phase response. *Advanced Internal Medicine*, 37, 313- 336.
- Barna, B. P., Deodhar, S. D., Gautam, S., Yen-Lieberman, B. & Roberts, D. (1984). Macrophage activation and generation of tumoricidal activity by liposome-associated human C-reactive protein. *Cancer Research*, 44, 305-310.
- Baumann, H. & Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunology Today*, 15(2), 74-80.
- Baybutt, H. N. & Holsboer, F. (1990). Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinology*, 127(1), 476-480.
- Bayer, L., Schöntube, M., Dörffel, W. (2000). CRP, IL-6 und PCT als Infektionsparameter bei onkologisch kranken Kindern. (C-reactive protein, interleukin-6 and procalcitonin as parameters of infection in pediatric patients with oncologic diseases). *Klinische Pädiatrie*, 212(6), 326-331.
- Ben-Baruch, A., Michiel, D. F. & Oppenheim, J. J. (1995). Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 11703-11706.
- Benveniste, J., Roubin, R., Chignard, M., Jouvin-Marche, E. & Le Couedic, J. P. (1982). Release of platelet-activating factor (PAF-acether) and 2-lyso PAF-acether from three cell types. *Inflammation Research*, 12(5), 711-713.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E. & Dinarello, C. A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 233(4764), 652-654.
- Bharadwaj, D., Mold, C., Markham, E. & Du Clos, T. W. (2001). Serum amyloid P component binds to Fcγ receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 166, 6735-6741.
- Bharadwaj, D., Stein, M-P., Volzer, M., Mold, C. & Du Clos, T. W. (1999). The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fcγ receptor II. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(4), 585-590.
- Black, S. G., Agrawal, A. & Samols, D. (2003). The phosphocholine and the polycation-binding sites on rabbit C-reactive protein are structurally and functionally distinct. *Molecular Immunology*, 39(16), 1045-1054.
- Black, S. G. (2005). *C-reactive protein: a study of its functional domains using transgenic mice*. Doctor of Philosophy Thesis. Cleveland: Department of Biochemistry, Case Western Reserve University.
- Blackburn, W. D. (1994). Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *The Journal of Rheumatology*, 21(42), 9-13.

- Blood, D. C. & Sttuddert, V. P. (2002). *Dicionário de Veterinária*. (2<sup>th</sup> ed.). Editora Guanabara Koogan S.A.
- Bone, R. C. (1991). The Pathogenesis of Sepsis. *Annals of Internal Medicine*, 115(6), 457-469.
- Boosman, R., Mutsaers, C. W. & Dieleman, S. J. (1990). Sympathico-adrenal effects of endotoxaemia in cattle. *The Veterinary Record*, 127(1), 11-14.
- Bottazzi, B., Vouret-Craviari, V., Bastone, A., De Gioia, L., Matteucci, C., Peri, G., Spreafico, F., Pausa, M., D'Ettorre, C., Gianazza, E., Tagliabue, A., Salmona, M., Tedesco, F., Introna, M. & Mantovani, A. (1997). Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 32817-32823.
- Bruguerolle, B., Bouvenot, G., Arnaud, C., Lévy, F., Mechkouri, M., Bartolin, R. & Peronne, R. (1986). Circadian rhythms of the so-called inflammation proteins in healthy subjects. *Revue du Rhumatisme et des Maladies Ostéoarticulaires*, 53(5), 313-316.
- Burton, S. A., Honor, D. J., Mackenzie, A. L., Eckersall, P. D., Markham, R. J. F. & Horney, B. S. (1994). C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. *American Journal of Veterinary Research*, 55(5), 613-618.
- Carlsen, E., Stinessen, M. B. & Prydz, H. (1987). Differential effect of  $\alpha$ -interferon and  $\gamma$ -interferon on thromboplastin response in monocytes and endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 70, 471-478.
- Casals, C., Varela, A., Ruano, M. L., Valiño, F., Pérez-Gil, J., Torre, N., Jorge, E., Tendillo, F. & Castillo-Olivares, J. (1998). Increase of C-reactive protein and decrease of surfactant protein A in surfactant after lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(1), 43-49.
- Caspi, D., Baltz, M. L., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R. M., Munn, E. A., Butress, N. & Pepys, M. B. (1984). Isolation and characterization of C- reactive protein from the dog. *Immunology*, 53(2), 307-313.
- Caspi, D., Snel, F. W., Batt, R. M., Bennett, D., Rutteman, G. R., Hartman, E. G., Baltz, M. L., Gruys, E. & Pepys, M. B. (1987). C-reactive protein in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 48(6), 919-921.
- Cermak, J., Key, N. S., Bach, R. R, Balla, J., Jacob, H. S. & Vercellotti, M. (1993). C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*, 82(2), 513-520.
- Cerón, J. J., Eckersall, P. D. & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85-89.
- Chambers, R. E., Hutton, C. W., Dieppe, P. A. & Witcher, J. T. (1991). Comparative study of C reactive protein and serum amyloid A protein in experimental inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 50, 677-679.



- Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M. & Witztum, J. L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13043-13048.
- Chedid, L., Carelli, L. & Audibert, F. (1979). Recent developments concerning muramyl dipeptide, a synthetic immunoregulating molecule. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 26, 631-641.
- Chelladurai, M., MacIntyre, S. S. & Kushner, I. (1982). Estimation of in vivo rates of C-reactive protein synthesis from serum turnover studies in rabbits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389(1), 437-438.
- Chi, M., Tridandapani, S., Zhong, W., Coggeshall, K. M. & Mortensen, R. F. (2002). C-reactive protein induces signalling through FcγRIIa on HL-60 Granulocytes. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1413-1418.
- Cole, D. J., Roussel, A. J. & Whitney, M. S. (1997). Interpreting a bovine CBC: Evaluating the leukon and acute-phase proteins. *Veterinary Medicine*, 92(5), 470-478.
- Conkling, P. R., Greenberg, C. S. & Weinberg, J. B. (1988). Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes. *Blood*, 72(1), 128-133.
- Conner, J. G., Eckersall, P. D., Ferguson, J. & Douglas, T. A. (1988a). Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science*, 45(1), 107-110.
- Conner, J. G., Eckersall, P. D., Wiseman, A., Aitchison, T. C. & Douglas, T. A. (1988b). Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science*, 44(1), 82-88.
- Content, J., De Wit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., van Damme, J. & Billiau, A. (1985). Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. *European Journal of Biochemistry*, 152(2), 253-257.
- Conway, E. M., Bach, R. R., Rosenberg, R. D. & Konigsberg, W. H. (1989). Tumor necrosis factor enhances expression of tissue factor mRNA in endothelial cells. *Thrombosis Research*, 53(3), 231-241.
- Crowell, R. E., Du Clos, T. W., Montoya, G., Heaphy, E. & Mold, C. (1991). C-reactive protein receptors on the human monocytic cell line U-937. Evidence for additional binding to Fc gamma RI. *The Journal of Immunology*, 147(10), 3445-3451.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkilä, I. & Tuomanen, E. I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377(6548), 435-438.
- Dalrymple, S. A., Lucian, L. A., Slattery, R., McNeil, T., Aud, D. M., Fuchino, S., Lee, F. & Murray, R. (1995). Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogens* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infection and Immunity*, 63(6), 2262- 2268.

- Deodhar, S. D., James, K., Chiang, T., Edinger, M. & Barna, B. P. (1982). Inhibition of lung metastases in mice bearing a malignant fibrosarcoma by treatment with liposomes containing human C-reactive protein. *Cancer Research*, 42, 5084-5088.
- Deutsch, J., Salman, M. & Rottem, S. (1995). An unusual polar lipid from the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. *European Journal of Biochemistry*, 227(3), 897-902.
- Di Camelli, R., Potempa, L. A., Siegel, J., Suyehira, L., Petras, K. & Gewurz, H. (1980). Binding reactivity of C-reactive protein for polycations. *The Journal of Immunology*, 125, 1933-1938.
- Dillman, R. C. & Coles, E. H. (1966). A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *American Journal of Veterinary Research*, 27(121), 1769-1775.
- Dinareello, C. A. (1983). Pathogenesis of fever during hemodialysis. *Contributions to Nephrology*, 36, 90-99.
- Dinareello, C. A. (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *The New England Journal of Medicine*, 311, 1413-1418.
- Dinareello, C. A. (1989). Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Advances in Immunology*, 44, 153-205.
- Dinareello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A. & O'Connor, J. V. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine*, 163, 1433-1450.
- Doe, W. F. & Henson, P. M. (1978). Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. I. Cytolytic effect on tumor target cells. *Journal of Experimental Medicine*, 148, 544-556.
- Du Clos, T. W. (1989). C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *The Journal of Immunology*, 143(8), 2553-2559.
- Du Clos, T. W. (1996). The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Molecular Biology Reports*, 23, 253-260.
- Du Clos, T. W. (2000). Function of C-reactive protein. *Annals of Medicine*, 32(4), 274-278.
- Du Clos, T. W. & Mold, C. (2001). The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14(3), 289-293.
- Du Clos, T. W., Mold, C., Paterson, P. Y., Alroy, J. & Gewurz, H. (1981). Localization of C-reactive protein in inflammatory lesions of experimental allergic encephalomyelitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 43(3), 565-573.
- Du Clos, T. W., Zlock, L. T. & Rubin, R. L. (1988). Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *The Journal of Immunology*, 141(12), 4266-4270.
- Durdey, P., Williams, N. S. & Brown, D. A. (1984). Serum carcinoembryonic antigen and acute phase reactant proteins in the pre-operative detection of fixation of colorectal tumours. *British Journal of Surgery*, 71(11), 881-884.

- Eckersall, P. D. (1995). Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comparative Haematology International*, 5(2), 93-97.
- Eckersall, P. D. (1999). The Acute phase response in animals. *Japanese Society of Veterinary Clinical Pathology*, 10-21.
- Eckersall, P.D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(7), 577-584.
- Eckersall, P. D. (2006a). Acute phase proteins as biomarkers of disease in companion and laboratory animals. Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, Arizona, 2-6 December.
- Eckersall, P. D. (2006b). Acute phase proteins: form, function and analyses. Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, Arizona, 2-6 December.
- Eckersall, P. D. (2006c). Measurement of acute phase proteins as biomarkers of disease. Proceedings of the Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, Arizona, 2-6 December.
- Eckersall, P. D. & Conner, J. G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 12, 169-178.
- Eckersall, P. D., Conner, J. G. & Harvie, J. (1991). An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications*, 15, 17-24.
- Eckersall, P. D., Conner, J. G. & Parton, H. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *The Veterinary Record*, 124(18), 490-491.
- Eckersall, P. D., Harvey, M. J., Ferguson, J. M., Renton, J. P., Nickson, D. A. & Boyd, J. S. (1993). Acute phase proteins in canine pregnancy (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 159-164.
- Eckersall, P. D., Saini, P. K. & McComb, C. (1996). The acute phase response of acid soluble glycoprotein,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51, 377-385.
- Falconer, J. S., Fearon, K. C., Ross, J. A., Elton, R., Wigmore, S. J., James, O. J. & Carter, B. C. (1995). Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer*, 75(8), 2077-2082.
- Fearon, D. T. & Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272, 50-54.
- Fidler, I. J. (1980). Therapy of spontaneous metastases by intravenous injection of liposomes containing lymphokines. *Science*, 208, 1469-1471.

- Filep, J. & Foldes-Filep, E. (1989). Effects of C-reactive protein on human neutrophil granulocytes challenged with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and platelet-activating factor. *Life Sciences*, 44(8), 517-524.
- Foldes-Filep, E., Filep, J. & Sirois, P. (1992). C-reactive protein inhibits intracellular calcium mobilization and superoxide production by guinea pig alveolar macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 51(1), 13-18.
- Fox, K. L., Li, J., Schweda, E. K., Vitiazeva, V., Makepeace, K., Jennings, M. P., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2008). Duplicate Copies of *lic1* direct the addition of multiple phosphocholine residues in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 76(2), 588-600
- Fransson, B. A., Karlstam, E., Bergstrom, A., Lagerstedt, A-S., Park, J. S., Evans, M. A. & Ragle, C. A. (2004). C-reactive protein in differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40, 391-399.
- Fransson, B. A., Karlstam, E., Lagerstedt, A., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J. S., Chew, B. P., Evans, M. A. & Ragle, C. A. (2006). C-reactive protein, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 10, 1-9.
- Fujise, H., Takanami, H., Yamamoto, M., Ohta, I., Yamamoto, S., Fukase, T., Naiki, M., Akihama, S., Ogawa, E. & Takahashi, R. (1992). Simple isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54(1), 165-167.
- Gabay, C. & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340(6), 448-454.
- Gamazo, C., López-Goñi, I. & Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología. Técnicas serológicas*. (3<sup>th</sup> ed.). Barcelona. Elsevier Masson.
- Ganz, P. A., Shell, W. E. & Tökés, Z. A. (1983). Evaluation of a radioimmunoassay for  $\alpha$ 1-acid glycoprotein to monitor therapy of cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 71(1), 25-30.
- Gerber, J. S. & Mosser, D. M. (2001). Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc $\gamma$  receptors. *The Journal of Immunology*, 166, 6861-6868.
- Gershov, D., Kim, S., Brot, N. & Elkon, K. B. (2000). C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1353-1364.
- Gewurz, H., Zhang, X. H. & Lint, T. F. (1995). Structure and function of the pentraxins. *Current Opinion in Immunology*, 7(1), 54-64.
- Giannakis, E., Jokiranta, T. S., Male, D. A., Ranganathan, S., Ormsby, R. J., Fischetti, V. A., Mold, C. & Gordon, D. L. (2003). A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein. *European Journal of Immunology*, 33(4), 962-969.

- Gillet, A. (2002). *La protein C-reactive chez le chien. Etude bibliographique et assai d'un kit utilisant une technique ELISA*. These pour obtenir le grade de Docteur Veterinaire. Lyon: Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
- Glauser, M. P., Zanetti, G., Baumgartner, J. D. & Cohen, J. (1991). Septic shock: pathogenesis. *Lancet*, 338(8769), 732-736.
- Gmür, R., Thurnheer, T. & Guggenheim, B. (1999). Dominant cross-reactive antibodies generated during the response to a variety of oral bacterial species detect phosphorylcholine. *Journal of Dental Research*, 78(1), 77-85.
- Goodman, A. R., Cardozo, T., Abagyan, R., Altmeyer, A., Wisniewski, H. G. & Vilcek, J. (1996). Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 7(2), 191-202.
- Gordon, A. H., Koy, A. (1985). *The Acute Phase Response to Injury and Infection: The Roles of Interleukin-1 and Other Mediators*. Elsevier Science Ltd.
- Gould, J. M. & Weiser, J. N. (2001). Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infection and Immunity*, 69(3), 1747-1754.
- Gruys, E., Obwolo, M. J. & Toussaint, M. J. (1994). Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry. *A review Veterinary Bull.*, 64, 1009-1018.
- Gruys, E., Toussaint, M. J., Landman, W. J., Tivapasi, M., Chamanza, R. & van Veen, L. (1999). Infection, Inflammation and Stress Inhibit Growth. Mechanisms and Non-specific Assessment of the Processes by Acute Phase Proteins. Wensing T., editor. *Production Diseases in Farm Animals. 10<sup>th</sup> International Conference, 1998*. Wageningen Press, Wageningen, 72-87. I
- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B(11), 1045-1056.
- Gruys, E., van Ederen, A. M., Alsemgeest, S. P., Kalsbeek, H. C. & Wensing, T. (1993). Acute phase protein values in blood of cattle as indicator of animals with pathological processes. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44(5), 107-111.
- Hack, C. E., Wolbink, G.-J., Schalkwijk, C., Speijer, H., Hermens, W. T. & van, den Bosch H. (1997). A role for secretory phospholipase A<sub>2</sub> and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunology Today*, 18(3), 111-115.
- Hayashi, S., Jinbo, T., Iguchi, K., Shimizu, M., Shimada, T., Nomura, M., Ishida, Y. & Yamamoto, S. (2001). A comparison of the concentrations of C-reactive protein and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. *Veterinary Research Communications*, 25(2), 117-120.
- Hayes, M. A. (1994). *Function of cytokines and acute phase proteins in inflammation*. Lumsden JH (ed) VI<sup>th</sup> Congress of the ISACB Proceedings, Guelph, Canada, 1-7.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal*, 334, 297-314.

- Heinrich, P. C., Castell, J. V. & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265(3), 621-636.
- Hibi, M., Nakajima, K. & Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *Journal of Molecular Medicine*, 74(1), 1-12.
- Hirschfield, G. M., Herbert, J., Kahan, M. C., Pepys, M. B. (2003). Human C-reactive protein does not protect against acute lipopolysaccharide challenge in mice. *The Journal of Immunology*, 171, 6046-6051.
- Hirvonen, J. (2000). *Acute Phase Response in Dairy Cattle*. Thesis. Helsinki: Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.
- Höfner, M. C., Fosbery, M. W., Eckersall, P. D. & Donaldson, A. I. (1994). Haptoglobin response of cattle infected with foot-and-mouth disease virus. *Research in Veterinary Science*, 57(1), 125-128.
- Hokama, Y., Coleman, M. K. & Riley, R. F. (1962). In vitro effects of C-reactive protein on phagocytosis. *Journal of Bacteriology*, 83(5), 1017-1024.
- Holm, J. L., Rozanski, E. A., Freeman, L. M. & Webster, C. R. (2004). C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14(3), 183-186.
- Horowitz, J., Volanakis, J. E. & Briles, D. E. (1987). Blood clearance of *Streptococcus pneumoniae* by C-reactive protein. *The Journal of Immunology*, 138(8), 2598-2603.
- Hulett, M. D. & Hogarth, P. M. (1994). Molecular basis of Fc receptor function. *Advances in Immunology*, 57, 1-127.
- Hundt, M., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R. E. (2001). Lack of specific receptors for C-reactive protein on white blood cells. *European Journal of Immunology*, 31(12), 3475-3483.
- Hurley, J. V. (1972). *Acute Inflammation*. Williams and Wilkins. Baltimore. MD.
- Hurter, K., Spreng, D., Rytz, U., Schawalder, P., Ott Knusel, F. & Schmokel, H. (2005). Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 169, 281-285.
- Ingenbleek, Y. & Carpentier, Y. A. (1985). A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 55(1), 91-101.
- Ingenbleek, Y. & Young, V. (1994). Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annual Review of Nutrition*, 14, 495-533.
- Jain, N. C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. Lea & Febiger. Philadelphia, United States of America.
- James, K. (1990). Interactions between cytokines and  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Immunology Today*, 11(5), 163-166.

- James, K., Hansen, B. & Gewurz, H. (1981). Binding of C-reactive protein to human lymphocytes. II. Interaction with a subset of cells bearing the Fc receptor. *The Journal of Immunology*, 127(6), 2545-2550.
- Jarva, H., Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Zipfel, P. F. & Meri, S. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3957-3962.
- Jennings, G. & Elia, M. (1996). Changes in protein distribution in normal and protein deficient rats during an acute-phase “injury” response. *British Journal of Nutrition*, 76, 123-132.
- Jialal, I., Devaraj, S. & Venugopal, S. K. (2004). C-Reactive Protein: Risk Marker or Mediator in Atherothrombosis? *Hypertension*, 44, 6-11.
- Jinbo, T., Ami, Y., Suzuki, Y., Kobune, F., Ro, S., Naiki, M., Iguchi, K. & Yamamoto, S. (1999). Concentrations of C-reactive protein in Normal Monkeys (*Macaca irus*) and in Monkeys inoculated with *Bordetella bronchiseptica* R-5 and Measles Virus. *Veterinary Research Communications*, 23(5), 265-274.
- Jordan, M., Otterness, I. G., Ng, R., Gessner, A., Rölinghoff, M. & Beuscher, H. U. (1995). Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *The Journal of Immunology*, 154(8), 4081-4090.
- Kallio, R. (2000). Traditional and new markers of infection in adult cancer patients and the possible interfering effect of underlying malignancy in these markers. Thesis. Oulu: Faculty of Medicine, University of Oulu.
- Kaplan, M. H. & Volanakis, J. E. (1974). Interaction of C-Reactive Protein with the Complement System. I. Consumption of Human Complement Associated with the Reaction of C-Reactive Protein with Pneumococcal C-polysaccharide and with the Choline Phosphatides, Lecithin and Sphingomyelin. *The Journal of Immunology*, 112, 2135-2147.
- Kilpatrick, J. M. & Virella, G. (1985a). Inhibition of platelet-activating factor by rabbit C-reactive protein. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 37(2), 276-281.
- Kilpatrick, J. M. & Volanakis, J. E. (1985b). Opsonic properties of C-reactive protein. Stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein-coated cells. *The Journal of Immunology*, 134(5), 3364-3370.
- Kimura, M., Toth, L. A., Agostini, H., Cady, A. B., Madje, J. A., Krueger, J. M. (1995). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 36, 1596-1605.
- Kindmark, C. O. (1971). Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various species of pathogenic bacteria. *Clinical & Experimental Immunology*, 8(6), 941-948.
- Kindt, J. T., Goldsby, R. A. & Osborn, B. A. (2007). *Kuby Immunology*. (6<sup>th</sup> ed.). W. H. Freeman and Company New York.

- Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T. J., Shrive, A. K., Bonifati, D. M., Gadjeva, M. G., Waters, P., Kojouharova, M. S., Chakraborty, T. & Agrawal, A. (2004). Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunology Letters*, 95(2), 113-128.
- Klein, B. & Bataille, R. (1992). Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 6(2), 273-284.
- Knapp, A., Schrod, W., Grevel, V., Ochtering, G. (2001). Concentrations of serum C-reactive protein (CRP) in dogs with complications in wound healing. *Proceedings of Veterinary World Healing Association, Hannover, Germany, 10-12 May*.
- Knolle, P., Löhr, H., Treichel, U., Dienes, H. P., Lohse, A., Schlaack, J. & Gerken, G. (1995). Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 33(10), 613-620.
- Köhler, W. & Prokop, O. (1978). Relationship between haptoglobin and *Streptococcus pyogenes* T4 antigens. *Nature*, 271, 373.
- Koj, A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1317(2), 84-94.
- Kraft, R., Ruchti, C., Burkhardt, A. & Cottier, H. (1992). Pathogenetic principles in the development of gut-derived infectious-toxic shock (GITS) and multiple organ failure. *Current Studies in Hematology & Blood Transfusion*, 59, 204-240.
- Kresl, J. J., Potempa, L. A., Anderson, B. & Radosевич, J. A. (1999). Inhibition of Mouse Mammary Adenocarcinoma (EMT6) Growth and Metastases in Mice by a Modified Form of C-Reactive Protein. *Tumor Biology*, 20, 72-78.
- Kuehn, N. F. & Gaunt, S. D. (1985). Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(4), 355-358.
- Kuribayashi, T., Shimada, T., Matsumoto, M., Kawato, K., Honjyo, T., Fukuyama, M., Yamamoto, Y. & Yamamoto, S. (2003). Determination of Serum C-Reactive Protein (CRP) in Healthy Beagle Dogs of Various Ages and Pregnant Beagle Dogs. *Experimental Animals*, 52(5), 387-390.
- Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389(1), 39-48.
- Kushner, I. (1993). Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspectives in Biology and Medicine*, 36(4), 611-622.
- Kushner, I. & Feldmann, G. (1978). Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *Journal of Experimental Medicine*, 148, 466-477.
- Kushner, I., Gewurz, H. & Benson, M. D. (1981). C-reactive protein and the acute-phase response. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 97(6), 739-749.



- Kushner, I., Jiang, S. L., Zhang, D., Lozanski, G. & Samols, D. (1995). Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Annals of the New York Academy Sciences*, 762, 102-107.
- Kushner, I. & Kaplan, M. (1961). Studies of acute phase protein: I. An immunohistochemical method for the localization of C-reactive protein in rabbits: association with necrosis in local inflammatory lesions. *The Journal of Experimental Medicine*, 114, 961- 974.
- Kushner, I. & Mackiewicz, A. (1987). Acute phase proteins as disease markers. *Disease Markers*, 5(1), 1-11.
- Kuta, A. E. & Baum, L. L. (1986). C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 164, 321-326.
- Langhans, W. (1996). Bacterial products and the control of ingestive behaviour: Clinical implications. *Nutrition*, 12(5), 303-315.
- Larrea, C. L. & González, J. R. (2006). *Imunologia: Biología y Patología del Sistema Imune*. (3<sup>th</sup> ed.). Panamerica Editorial.
- Le Coutre, P., Kreuzer, K-A., Na, I-K., Lupberger, J., Holdhoff, M., Appelt, C., Schwarz, M., Müller, C., Gambacorti-Passerini, C., Platzbecker, U., Bonnet, R., Ehninger, G. & Schmidt, C. A. (2002). Determination of  $\alpha$ -1 Acid Glycoprotein in Patients with Ph<sup>+</sup> Chronic Myeloid Leukaemia during the First 13 Weeks of Therapy with STI571. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 28(1), 75-85.
- Legouffe, E., Rodriguez, C., Picgt, M. C., Richard, B., Klein, B., Rossi, J. F. & Commes, T. (1998). C-Reactive Protein Serum Level is a Valuable and Simple Prognostic Marker in non-Hodgkin's Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 31(3 & 4), 351-357.
- Le, J. M. & Vilcek, J. (1989). Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Laboratory Investigation*, 61(6), 588-602.
- Lee, R. T., Takagahara, I. & Lee, Y. C. (2002). Mapping the binding areas of human C-reactive protein for phosphorycholine and polycationic compounds. Relationship between the two types of binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 225-232.
- Lloyd, A. R. & Oppenheim, J. J. (1992). Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunology Today*, 13(5), 169-172.
- Lohuis, J. A., Verheijden, J. H., Burvenich, C. & van Miert, A. S. (1988). Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration. 2. Metabolic aspects. *Veterinary Quarterly*, 10, 109-125.
- Lowry, S. F. & Moldawer, L. L. (1993). Modulation of Cytokine Responses in Sepsis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 685(1), 471-482.
- Loyer, P., Ilyin, G., Razzak, Z. A., Banchereau, J., Dezier, J-F., Campion, J-P., Guguen-Guillouzo, C. & Guillouzo, A. (1993). Interleukin 4 inhibits the production of some acute-

- phase proteins by human hepatocytes in primary culture. *FEBS Letters*, 336(2), 215-220.
- Lysenko, E., Richards, J. C., Cox, A. D., Stewart, A., Martin, A., Kapoor, M. & Weiser, J. N. (2000). The position of phosphorycholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein mediated killing. *Molecular Microbiology*, 35(1), 234-245.
- MacIntyre, S. S., Schultz, D. & Kushner, I. (1982). Biosynthesis of C-Reactive Protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389(1), 76-87.
- Mackiewicz, A. (1997). Acute phase proteins and transformed cells. *International Review of Cytology*, 170, 225-300.
- MacLeod, C. M. & Avery, O. T. (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in blood. III. Immunological Properties of the C-Reactive Protein and Its Differentiation from Normal Blood Proteins. *The Journal of Experimental Medicine*, 73, 191-200.
- Mahon, C. R. & Tice, D. (2006). *Clinical Laboratory Immunology*. Pearson Education.
- Mallya, R. K., de Beer, F. C., Berry, H., Hamilton, E. D., Mace, B. E. & Pepys, M. B. (1982). Correlation of clinical parameters of disease activity in rheumatoid arthritis with serum concentration of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate. *The Journal of Rheumatology*, 9(2), 224-228.
- Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Reimers, J. I., Pociot, F., Andersen, H. U., Karlsen, A., Bjerre, U. & Bergholdt R. (1995). Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network. *European Journal of Endocrinology*, 133(6), 660-671
- Marnell, L. L., Mold, C. & Du Clos, T. W. (2005). C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology*, 117(2), 104-111.
- Marnell, L. L., Mold, C., Vollzer, M. A., Burlingame, R. W. & Du Clos, T. W. (1995). C-reactive protein binds to FcγRI in transfected COS cells. *The Journal of Immunology*, 155, 2185-2193.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romic, Z., Simec, Z. & Ceron, J.J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 242-250.
- Maudsley, S. & Pepys, M. B. (1987). Immunochemical cross-reactions between pentraxins of different species. *Immunology*, 62(1), 17-22.
- Mazhar, D. & Ngan, S. (2006). C-reactive protein and colorectal cancer. *QJMed.*, 99(8), 555-559.
- McGrotty, Y. L., McComb, C., Ramsey, I. K. & Eckersall, P. D. (2001). Evaluation of a rapid assay for canine CRP. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 30, 164.
- McGrotty, Y. L., Knottenbelt, C. M., Ramsey, I. K., Reid, S. W. & Eckersall, P. D. (2004). Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Record*, 154, 175-176.

- Mercer, D. W. & Talamo, T. S. (1985). Multiple markers of malignancy in sera of patients with colorectal carcinoma: preliminary clinical studies. *Clinical Chemistry*, 31, 1824-1828.
- Mischke, R., Waterston, M. & Eckersall, P.D. (2006). Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *The Veterinary Journal*, 174(1), 188-192.
- Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., Satoh, S., Niwa, M., Senoh, H., Fujiwara, H. (1994). T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *Journal of Experimental Medicine*, 179, 1529-1537.
- Mold, C., Baca, R. & Du Clos, T. W. (2002a). Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fcγ receptors. *Journal of Autoimmunity*, 19(3), 147-154.
- Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T. W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 42(1-3), 23-30.
- Mold, C., Gresham, H. D. & Du Clos, T. W. (2001). Serum Amyloid P Component and C-Reactive Protein Mediate Phagocytosis Through Murine FcγRs. *The Journal of Immunology*, 166, 1200-1205.
- Mold, C., Nakayama, S., Holzer, T. J., Gewurz, H. & Du Clos, T. W. (1981). C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 154, 1703-1708.
- Mold, C., Rodic-Polic, B. & Du Clos, T. W. (2002b). Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fcγ receptors. *The Journal of Immunology*, 168(12), 6375-6381.
- Mold, C., Rodriguez, W., Rodic-Polic, B. & Du Clos, T. W. (2002c). C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcγR. *The Journal of Immunology*, 169(12), 7019-7025.
- Monshouwer, M., Witkamp, R. F., Nijmeijer, S. M., van Amsterdam, J. G. & van Miert, A. S. (1996a). Suppression of Cytochrome P450- and UDP Glucuronosyl Transferase-Dependent Enzyme Activities by Proinflammatory Cytokines and Possible Role of Nitric Oxide in Primary cultures of Pig Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137(2), 237-244.
- Monshouwer, M., Witkamp, R. F., Nijmeijer, S. M., van Leengoed, L. A., Vernooy, H. C., Verheijden, J. H. & van Miert, A. S. (1996b). A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(15), 382-388.
- Moore, K. W., Malefyt, R. d. W., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683-765.
- Mortensen, R. F. (2001). C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunologic Research*, 24(2), 163-176.

- Mortesen, R. F. & Duszkievicz, J. A. (1977). Mediation of CRP-Dependent Phagocytosis through Mouse Macrophage Fc-Receptors. *The Journal of Immunology*, 119, 1611-1616.
- Mortensen, R. F., Osmand, A. P., Lint, T. F. & Gewurz, H. (1976). Interaction of C-Reactive Protein with Lymphocytes and Monocytes: Complement-Dependent Adherence and Phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 117, 774-781.
- Moshage, H. (1997). Cytokines and hepatic phase response. *The Journal of Pathology*, 181(3), 257-266.
- Mosser, J. L. & Tomasz, A. (1970). Choline-containing Teichoic Acid as a Structural Component of Pneumococcal Cell Wall and Its Role in Sensitivity to Lysis by an Autolytic Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 287-298.
- Motoi, Y., Itoh, H., Tamura, K., Miyamoto, T., Oohashi, T. & Nagasawa, S. (1993). Correlation of serum concentration of alpha 1-acid glycoprotein with lymphocyte blastogenesis and development of experimentally induced or naturally acquired hepatic abscesses in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 53(4), 574-579.
- Murtaugh, M. P., Baarsch, M. J., Zhou, Y., Scamurra, R. W. & Lin, G. (1996). Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1-4), 45-55.
- Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y. & Tsujimoto, H. (2008). C-Reactive Protein Concentrations in Dogs with Various Diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 70(2), 127-131.
- Nakayama, S., Gewurz, H., Holzer, T., Du Clos, T. W. & Mold, C. (1983). The role of the spleen in the protective effect of C-reactive protein in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 54(2), 319-326.
- Nakayama, T., Sonoda, S., Urano, T., Yamada, T. & Okada, M. (1993). Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clinical Chemistry*, 39, 293-297.
- Nawroth, P. P., Bank, I., Handley, D., Cassimeris, J., Chess, L. & Stern, D. (1986a). Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *The Journal of Experimental Medicine*, 163, 1363-1375.
- Nawroth, P. P., Handley, D. A., Esmon, C. T. & Stern, D. M. (1986b). Interleucine 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 83(10), 3460-3464.
- Nishikawa, T., Hagihara, K., Serada, S., Isobe, T., Matsumura, A., Song, J., Tanaka, T., Kawase, I., Naka, T. & Yoshizaki, K. (2008). Transcriptional Complex Formation of c-Fos, STAT3, and Hepatocyte NF-1 $\alpha$  Is Essential for Cytokine-Driven C-Reactive Protein Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 180, 3492-3501.
- Ndung'u, J. M., Eckersall, P. D. & Jennings, F. W. (1991). Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Tropica*, 49(2), 77-86.

- Noursadeghi, M., Bieckerstaff, M. C., Gallimore, J. R., Cohen, H. J. & Pepys, M. B. (2000). Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 14584.
- Nozoe, T., Matsumata, T., Kitamura, M. & Sugimachi, K. (1998). Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. *The American Journal of Surgery*, 176(4), 335-338.
- Nozoe, T., Saeki, H. & Sugimachi, K. (2001). Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator of prognosis in esophageal carcinoma. *The American Journal of Surgery*, 182(2), 197-201.
- O' Flaherty, J. T., Miller, C. H., Lewis, J. C., Wykle, R. L., Bass, D. A., McCall, C. E., Waite, M. & DeChatelet, L. R. (1981). Neutrophil responses to platelet-activating factor. *Inflammation*, 5(3), 193-201.
- Ohlsson, K., Björk, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R. & Thompson, R. C. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*, 348, 550-552.
- Oliveira, E. B., Gotschlich, E. C. & Liu, T. Y. (1980). Comparative studies on the binding properties of human and rabbit C-reactive proteins. *The Journal of Immunology*, 124, 1396-1402.
- Olson, N. C., Hellyer, P. W. & Dodam, J. R. (1995). Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *British Veterinary Journal*, 151(5), 489-522.
- Onishi, T., Inokuma, H., Ono, K., Soeda, S., Nogushi, K. & Sasaki, K. (2000). C-reactive Protein Concentrations in Normal and Diseased Dogs. Measured by Laser Nephelometric Immunoassay. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 53(9), 595-601.
- Osterud, B., Rapaport, S. I. (1977). Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 5260-5264.
- Otabe, K., Ito, T., Sugimoto, T. & Yamamoto, S. (2000). C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Laboratory Animals*, 34, 434-438.
- Otabe, K., Sugimoto, T., Jinbo, T., Honda, M., Kitao, S., Hayashi, S., Shimizu, M. & Yamamoto, S. (1998). Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Veterinary Research Communications*, 22(2), 77-85.
- Paape, M. J. & Capuco, A. V. (1997). Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal of Animal Science*, 75(2), 556-565.
- Paape, M. J., Schultze, W. D., Desjardins, C. & Miller, R. H. (1974). Plasma corticosteroid, circulating leucocyte and milk somatic cell responses to Escherichia coli endotoxin-induced mastitis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 145, 553-559.

- Paltrinieri, S. (2007). Early Biomarkers of Inflammation in Dogs and Cats: The Acute Phase Protein. *Veterinary Research Communications*, 31, 125-129.
- Pannen, B. H. & Robotham, J. L. (1995). The acute-phase response. *New Horiz.*, 3, 183-197.
- Parra, M. D., Tecles, F., Martinez-Subiela, S. & Cerón, J. J. (2005). C-reactive protein measurement in canine saliva. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(2), 139-144.
- Parra, M. D., Papasouliotis, K. & Cerón, J. J. (2006a). Concentrations of C-reactive protein in effusion in dogs. *The Veterinary Record*, 158, 753-757.
- Parra, M. D., Tuomola, M., Cabezas-Herrera, J. & Cerón, J. J. (2006b). Analytical and Clinical Validation of a Time-resolved Immunofluorometric Assay (TR-IFMA) for Canine C-reactive Protein in Serum. *Veterinary Research Communications*, 30(2), 113-116.
- Pedersen, L. M. & Sørensen, P. G. (2003). Mediators of inflammation correlate with microalbuminuria in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, 121(2), 275-279.
- Peltola, H. & Räsänen, J. A. (1982). Quantitative C-reactive protein in relation to erythrocyte sedimentation rate, fever, and duration of antimicrobial therapy in bacteraemic diseases of childhood. *Journal of Infection*, 5 (3), 257-267.
- Pepys, M.B. (1981) C-reactive protein fifty years on. *Lancet*, 653-657.
- Pepys, M. B. & Baltz, M. L. (1983). Acute phase proteins with special reference to CRP and related protein (pentraxins) and serum amyloid A. *Advances in Immunology*, 34, 141-221.
- Pepys, M. B., Baltz, M., Gomer, K., Davies, A. J. & Doenhoff, M. (1979). Serum amyloide P-component is an acute-phase reactant in the mouse. *Nature*, 278, 259-261.
- Peterson, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163-187.
- Pickup, J. C. & Crook, M. A. (1998). Is type II diabetes mellitus a disease of innate immune system. *Diabetologia*, 41, 1241-1248.
- Potempa, L. A., Siegel, J. N. & Gewurz, H. (1981). Binding activity of C-reactive protein for polycations. II. Modulatory effects of calcium and phosphocholine. *The Journal of Immunology*, 127, 1509-1514.
- Póvoa. (2000). Marcadores da sepsis. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*, 9, 249-250.
- Prydz, H. & Allison, A. C. (1978). Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes. *Thrombosis and Haemostasis*, 39, 582- 591.
- Quinn, M. T. (1995). Low-molecular-weight GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 58(3), 263- 276.
- Raynes, J.G. (1994). The acute phase response. *Biochemical Society Transaction*, 22(1), 69-74.

- Reardon, M. J. & Pierce, K. R. (1981). Acute experimental canine ehrlichiosis. *Veterinary Pathology*, 18, 48-61
- Ridker, P. M. (2003). Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation*, 107, 363-369.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreir, M. & Brade, H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The Journal of the Federation American Societies for Experimental Biology*, 8, 217-225.
- Rikihisa, Y., Yamamoto, S., Kwak, I., Iqbal, Z., Kociba, G., Mott, J. & Chichanasiriwithaya, W. (1994). C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 912-917.
- Rivers, R. P., Hathaway, W. E. & Weston, W. L. (1975). The Endotoxin-induced Coagulant Activity of Human Monocytes. *British Journal of Haematology*, 30(3), 311- 316.
- Robey, F. A., Jones, K. D., Tanaka, T. & Liu, T. Y. (1984). Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 7311-7316.
- Rogowski, O., Vered, Y., Shapira, I., Hirsh, M., Zakuf, V. & Berliner, S. (2005). Introducing the wide range C-reactive protein (wr-CRP) into clinical use for the detection of microinflammation. *Clinica Chimica Acta*, 358, 151-158.
- Routledge, P. A. (1986). The plasma protein binding of basic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 22, 499-506.
- Saini, P. K. & Webert, D.W. (1991). Application of acute phase reactants during antemortem and postmortem meat inspection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198, 1898-1901.
- Salmon, J. E. & Pricop, L. (2001). Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis and Rheumatism*, 44, 739-750.
- Salonen, A. M., Vartio, T., Hedman, K., & Vaheri, A. (1984). Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 1496-1501.
- Sasanelli, M., Paradies, P., Caprariis, D., Greco, B., De Palo, P., Palmisano, D. & Carelli, G. (2007). Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Veterinary Research Communications*, 31(1), 335-338.
- Sato, S., Suzuki, T. & Okada, K. (1995). Suppression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57(2), 373-375.
- Scarpati, E. M. & Sadler, J. E. (1989). Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 20705- 20713.

- Schall, T. J. & Bacon, K. B. (1994). Chemokines, leukocyte trafficking and inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 6, 865-873.
- Schenkein, H., Barbour, S., Berry, C., Kipps, B. & Tew, J. (2000). Invasion of Human Vascular Endothelial Cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the Receptor for Platelet-Activating Factor. *Infection and Immunity*, 68(9), 5416-5419.
- Schenkein, H., Gunsolley, J., Best, Al., Harrison, M. T., Hahn, C., Wu, J. & Tew, J. (1999). Antiphosphorylcholine Antibody Levels Are Elevated in Humans with Periodontal Diseases. *Infection and Immunity*, 67(1), 4814-4818.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endress, S., Ghorbani, R., Clark, S. C. & Dinarello, C. A. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 supresses IL-1 and TNF. *Blood*, 75(1), 40-47.
- Schreiber, R. D., Pace, J. L., Russel, S. W., Altman, A. & Katz, D. H. (1983). Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: physiochemical and biosynthetic resemblance to gamma-interferon. *The Journal of Immunology*, 131(2), 826-832.
- Schwalbe, R. A., Dahlbäck, B., Coe, J. E. & Nelsestuen, G. L. (1992). Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry*, 31(20), 4907-4915.
- Sehgal, P. B., Grieninger, G. & Tosato, G. (1988). Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Annals of the New York Academy of Science*, 557, 1-583.
- Shimada, T., Ishida, Y., Shimizu, M., Nomura, M., Kawato, K., Iguchi, K. & Jinbo, T. (2002). Monitoring C-reactive Protein in Beagle Dogs Experimentally Inoculated with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications*, 26(3), 171-177.
- Shrive, A. K., Gheetham, G. M., Holden, D., Myles, D. A., Turnell, W. G., Volanakis, J. E., Pepys, M. B., Bloomer, A. C. & Greenhough, T. J. (1996). Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nature Structural Biology*, 3, 346-354.
- Siegel, J., Rent, R. & Gewurz, H. (1974). Interactions of C-reactive protein with the complement system. I. Protamine-induced consumption of complement in acute phase sera. *The Journal of Experimental Medicine*, 140(3), 631-647.
- Sitton, N., Taggart, A., Dixon, J., Surrall, K. & Bird, H. (1984). Circadian variation in biochemical assessments used to monitor rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 43, 444-450.
- Sjöberg, A. P., Trouw, L. A., McGrath, F. D. G., Hack, C. E. & Blom, A. M. (2006). Regulation of Complement Activation by C-Reactive Protein: Targeting of the Inhibitory of C4b-Binding Protein. *The Journal of Immunology*, 176, 7612-7620.
- Staal-van den Brekel, A. J., Dentener, M. A., Schols, A. M., Buurman, W. A. & Wouters, E. F. (1995). Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 13, 2600-2605.



- Stamatiades, A. P., Manouras, A. J., Triantos, G. N., Ketergiannakis, V. A. & Apostolidis, N. S. (1992). Combination of serum carcino-embryonic antigen and C-reactive protein – a useful test in preoperative staging of colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 18(1), 41-43.
- Stein, M-P., Edberg, J. C., Kimberly, R. P., Mangan, E. K., Bharadwaj, D., Mold, C. & Du Clos, T. W. (2000a). C-reactive protein binding to FcγRIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 369-376.
- Stein, M-P., Mold, C. & Du Clos, T. W. (2000b). C-reactive protein binding to murine leukocytes requires Fcγ receptors. *The Journal of Immunology*, 164, 1514-1520.
- Stephensen, C. B. (1999). Burden of Infection on Growth Failure. *The Journal of Nutrition*, 129 (2), 534-538.
- Stimler, N., Bloor, C. M., Hugli, T. E., Wykle, R. L., McCall, C. E. & O'Flaherty, J. T. (1981). Anaphylactic actions of platelet-activating factor. *American Journal of Pathology*, 105, 64-69.
- Stone, R. (1994). Sepsis: An Immune System Gone Haywire. *Science*, 264, 365-367.
- Suffredini, A. F., Fantuzzi, G., Badolato, R., Oppenheim, J. J. & O'Grady, N. (1999). New Insights into the Biology of the Acute Phase Response. *Journal of Clinical Immunology*, 19(4), 203-214.
- Suresh, M. V., Singh, S. K., Ferguson, Jr. D., Agrawal, A. (2007). Human C-Reactive Protein Protects Mice from *Streptococcus pneumoniae* Infection without Binding to Pneumococcal C-Polysaccharide. *The Journal of Immunology*, 178, 1158-1163.
- Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg li, K., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2000). Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Molecular Microbiology*, 37(1), 13-27.
- Szalai, A. J., Agrawal, A., Greenhough, T. J. & Volanakis, J. E. (1997). C-reactive protein structural biology, gene expression, and host defence function. *Immunologic Research*, 16, 127-136.
- Szalai, A. J., Agrawal, A., Greenhough, T. J. & Volanakis, J. E. (1999). C-reactive protein: structural biology and host defence function. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37(3), 265-270.
- Szalai, A. J., Briles, D. E. & Volanakis, J. E. (1995). Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *The Journal of Immunology*, 155(5), 2557-2563.
- Szalai, A. J., Briles, D. E. & Volanakis, J. E. (1996). Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 64(11), 4850-4853.
- Szalai, A. J., Nataf, S., Hu, X. Z. & Barnum, S. R. (2002). Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5792- 5797.

- Szalai, A. J., VanCott, J. L., McGhee, J. R., Volanakis, J. E. & Benjamin, W. H. (2000). Human C-reactive protein is protective against fatal *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in Transgenic mice. *Infection and Immunity*, 68(10), 5652-5656.
- Tagata, K., Yokoyama, S., Ginbo, T., Honda, M., Okimura, T., Odakura, M., Nomura, M. & Yamamoto, S. (1996). Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Veterinary Research Communications*, 20(1), 21-30.
- Tebo, J. M. & Mortensen, R. F. (1990). Characterization and isolation of a C-reactive protein receptor from the human monocyte cell line U-937. *The Journal of Immunology*, 144(1), 231- 238.
- Tebo, J. M. & Mortensen, R. F. (1991). Internalization and degradation of receptor bound C-reactive protein by U-937 cells. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and tumoricidal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1095(3), 210-216.
- Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U., Ceron, J. J. & Paltrinieri, S. (2005). Preliminary studies of serum acute- phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), 865-870.
- Thompson, D., Milford-Ward, A. & Whicher, J. T. (1992). The value of acute phase protein measurements in clinical practice. *Annals of Clinical Biochemistry*, 29, 123-131.
- Thompson, D., Pepys, M. B. & Wood, S. P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7, 169-177.
- Tilg, H., Vannier, E., Vachino, G., Dinarello, C. A. & Mier, J. W. (1993). Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins; preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(5), 1629-1636.
- Tillet, W. S. & Francis, T. J. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein fraction from pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine*, 52, 561-571.
- Tizard, I. R. (2009). *Veterinary Immunology: An Introduction*. (8<sup>th</sup> ed.). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Toussaint, M. J. & van Ederen, A. M., Gruys, E. (1995). Implication of clinical pathology in assessment of animal health and in animal production and meat inspection. *Comparative Haematology International*, 5(3), 149-157.
- Troy, G. C. & Forrester, S. D. (1990). Canine ehrlichiosis. In C. E. Green (Ed.), *Infections diseases of the dog and cat*. (pp. 404-418). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Tsui, C. C., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Barnes, C. & Worley, P. F. (1996). Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2463-2478
- Ulevitch, R.J. & Tobias, P.S. (1994). Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signalling. *Current Opinion in Immunology*, 6(1), 125-130.

- Unkeless, J. C., Scigliano, E. & Freedman, V. H. (1988). Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annual Review of Immunology*, 6, 251- 281.
- van de Winkel, J. G. & Anderson, C. L. (1991). Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 49(5), 511-524.
- van Miert, A. S. (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Veterinary Quarterly*, 17, 41-50.
- van Reeth, K., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (1998). Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 1076-1079.
- Venugopal, S. K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P. & Jialal, I. (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 106(12), 1439-1441.
- Vergobbi, J. P. (1992). *Contribution a l'étude de l'utilisation clinique de la protéine C-réactive chez le chien*. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Alfort: École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- Vigo, C. (1985). Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 3418-3422.
- Volanakis, J. E. & Kaplan, M. H. (1971). Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 136, 612-614.
- Volanakis, J. E. & Wirtz, K. W. (1979). Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature*, 281, 155-157.
- Volanakis, J. E. (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology*, 38(2-3), 189-197.
- Xia, D. & Samols, D. (1997). Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2575-2580.
- Wakabayashi, G., Gelfand, J. A., Burke, J. F., Thompson, R. C. & Dinarello, C. A. (1991). A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. *The Journal of the Federation American Societies for Experimental Biology*, 5, 338-343.
- Walker, J. S., Rundquist, J. D., Taylor, R., Wilson, B. L., Andrews, M. R., Barck, J., Hogge, A. L., Huxsoll, D. L., Hildebrandt, P. K. & Nims, R. M. (1970). Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 157, 43-55.
- Walport, M. J. (2001). Complement-First of Two Parts. *The New England Journal of Medicine*, 344(14), 1058-1066.

- Weiser, J. N., Goldberg, J. B., Pan, N., Wilson, L. & Virji, M. (1998a). The Phosphorylcholine Epitope Undergoes Phase Variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitides* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity*, 66(9), 4263-4267.
- Weiser, J. N., Pan, N., McGowan, K. L., Musher, D., Martin, A. & Richards, J. (1998b). Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 631-640.
- Weiser, J. N., Shchepetov, M. & Chong, S. T. (1997). Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 65(3), 943-950.
- Wernersson, S., Karlsson, M.C., Dahlstrom, J., Mattsson, R., Verbeek, J. S. & Heyman, B. (1999). IgG-mediated enhancement of antibody responses in low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gammaRII-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 163(2), 618-622.
- Werling, D., Sutter, F., Arnold, M., Kun, G., Tooten, P. C. J. & Gruys, E. (1996). Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Research in Veterinary Science*, 61, 252-257.
- Whicher, J. T., Chambers, R. E., Higginson, J., Nashef, L. & Higgins, P. G. (1985). Acute phase response of serum amyloid A protein and C reactive protein to the common cold and influenza. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 312-316.
- Whisler, R. L., Newhouse, Y. G. & Mortensen, R. F. (1983). C reactive protein (CRP) mediated modulation of human B cell colony development. *The Journal of Immunology*, 130(1), 248-253.
- Whisler, R. L., Proctor, V. K., Downs, E. C. & Mortensen, R. F. (1986). Modulation of human monocyte chemotaxis and procoagulant activity by human C-reactive protein (CRP). *Lymphokine Research*, 5(3), 223-228.
- Wickham, N. W., Vercellotti, G. M., Hammerschmidt, D. E. & Jacob, H. S. (1991). Complement activation by C-reactive protein: Enhancement by chylomicrons. *Clinical Research*, 39, 335.
- Wieland, A., Kerbl, R., Berghold, A., Schwinger, W., Mann, G. & Urban, C. (2003). C-reactive protein (CRP) as tumour marker in pediatric and adolescent patients with Hodgkin disease. *Medical and Pediatric Oncology*, 41, 21-25.
- Wigmore, S. J., MacMahon, A. J., Sturgeon, C. M. & Fearon, K. C. (2001). Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 88(2), 255-260.
- Wysocka, M., Kubin, M., Vieira, L. Q., Ozmen, L., Garrota, G., Scott, P. & Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12 is required for interferon- $\gamma$  production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *European Journal of Immunology*, 25(3), 672-676.
- Yamagishi, Y., Senoo, Y., Machida, K., Fukui, J., Takamatsu, E., Fujimoto, Y., Sawada, T., Arakawa, T., Nakamura, F., Sasaki, K. & Iwata, H. (1989). Study in within-individual and

- between-individual variations on acute phase reactants in healthy subjects. *Japanese Journal of Medical Technology*, 38, 21-28.
- Yamamoto, S., Miyali, S., Abe, N., Otabe, K., Furukawa, E. & Naiki, M. (1993a). Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. *Veterinary Research Communications*, 17(4), 259-266.
- Yamamoto, S., Shida, T., Honda, M., Ashida, Y., Rikihisa, Y., Odakura, M., Hayashi, S., Nomura, M. & Isayama, Y. (1994a). Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (phase I cells). *Veterinary Research Communications*, 18(5), 347-357.
- Yamamoto, S., Shida, T., Miyaji, H., Santsuka, H., Fujise, H., Mukawa, K., Furukawa, E., Nagae, T. & Naiki M. (1993b). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17(2), 85-93.
- Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M. & Naiki, M. (1994b). Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Veterinary Quarterly*, 16, 74-77.
- Yamamoto, S., Tagata, K., Nagahata, H., Ishikawa, Y., Morimatsu, M. & Naiki, M. (1992). Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 36, 293-301.
- Yamashita, K., Fujinaga, T., Miyamoto, T., Hagio, M., Izumisawa, Y., Knoti, T. (1994). Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56(3), 487-492.
- Yother, J., Volanakis, J. E. & Brilles, D. E. (1982). Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *The Journal of Immunology*, 128, 2374-2376.
- Zahedi, K. & Mortensen, R. F. (1986). Macrophage tumoricidal activity induced by human C-reactive protein. *Cancer Research*, 46, 5077-5083.
- Zahedi, K., Tebo, J. M., Siripont, J., Klimo, G. F. & Mortensen, R. F. (1989). Binding of human C-reactive protein to mouse macrophages is mediated by distinct receptors. *The Journal of Immunology*, 142(7), 2384-2392.
- Zeller, J. M., Landay, A. L., Lint, T. F. & Gewurz, H. (1986). Enhancement of human peripheral blood monocyte respiratory burst activity by aggregated C-reactive protein. *Journal of Leukocyte Biology*, 40(6), 769-783.
- Zhong, W., Zen, Q., Tebo, J., Schlottmann, K., Coggeshall, M. & Mortensen, R. (1998). Effect of Human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signalling. *The Journal of Immunology*, 161, 2533- 2540.

## 5. ANEXOS

### 5.1 Anexo i

A identificação, estímulo iatrotópico e outras alterações concomitantes registadas nos pacientes incluídos no GE encontram-se sumariadas nas tabelas seguintes.

**Tabela 24. Identificação, estímulo iatrotópico e problemas concomitantes de cada animal incluído no Subgrupo I do GE**

| NOME          | RAÇA      | SEXO      | IDADE   | ESTÍMULO IATROTÓPICO  | OUTROS PROBLEMAS  |
|---------------|-----------|-----------|---------|---|---|
| <b>Nina</b>   | x Caniche | Feminino  | 7 anos  | Pequena ferida lombar com focos de necrose  | Lipoma (membro) Neoplasia indeterminada (pálpebra)<br>Carcinoma complexo (mamário)<br>Hiperlactatémia                               |
| <b>Nino</b>   | SRD       | Masculino | 15 anos | Ferida profunda afectando os tecidos musculares.<br>Espaço morto                          | Colapso de traqueia<br>Ligeira hepatomegália<br>Hipocalémia<br>Hiperglicémia<br>Hiperlactatémia<br>Anemia<br>Tombocitopénia<br>FA ↑ |
| <b>Ruca</b>   | SRD       | Masculino | 8 anos  | Feridas cervicais profundas (trás lacerações)<br>Ligeira hemorragia<br>Hematoma abdominal | Laceração na cabeça<br>Verruga MPE  |
| <b>Cherne</b> | SRD       | Masculino | 6 anos  | Lesões cervicais, uma delas profunda, inflamada e com espaço morto                        | Hipoglicémia<br>ST ↑  |

SRD – Sem Raça Determinada | FA – Fosfatase Alcalina | MPE – Membro Posterior Esquerdo | ST – Sólidos Totais

**Tabela 25. Identificação, estímulo iatrotópico e problemas concomitantes de cada animal incluído no Subgrupo II do GE**

| <b>NOME</b>     | <b>RAÇA</b>                     | <b>SEXO</b> | <b>IDADE</b> | <b>ESTÍMULO IATROTÓPICO</b>  | <b>OUTROS PROBLEMAS</b>  |
|-----------------|---------------------------------|-------------|--------------|--|--|
| <b>Badochas</b> | Labrador                        | Masculino   | 3 meses      | Fractura de 4 costelas (direitas)<br>Lacerações torácicas  | Não vacinado<br>Leucopénia<br>Anemia<br>FA↑  |
| <b>Kikas</b>    | SRD                             | Feminino    | 1 ano        | Ferida cervical profunda<br>Ulceração da musculatura cervical<br>Conspuração com pelos                         | Hipoglicémia   |
| <b>Micolli</b>  | SRD                             | Masculino   | 2 anos       | Laceração inguinal profunda e hemorrágica<br>Hematomas inguinais<br>Dor coxo-femural                           | Hipocalémia<br>Hipoglicémia<br>AST e ALT↑.   |
| <b>Rex</b>      | Pastor Alemão x Husky Siberiano | Masculino   | 10 anos      | Ferida profunda com exsudado sero-sanguinolento no MPD (3 perfurações)<br>MPD edemacido e purulento, sem apoio | Hipertermia.<br>Hipoglicémia<br>Hipocalcémia.<br>Ligeira leucopénia.<br>FA↑.                 |
| <b>Sabry</b>    | SRD                             | Masculino   | 12 anos      | Lacerações profundas na região torácica.   | Hemoconcentração<br>Leucopénia<br>AST ↑<br>Hipotermia  |
| <b>Sássá</b>    | Epanhol Breton                  | Masculino   | 10 anos      | Fractura da tíbia e fíbula do MAD.<br>Ligeira contusão pulmonar  | Insuficiência Cardíaca<br>Hipoglicémia<br>Hiperlactatémia<br>Hipocalcémia<br>FA↑             |
| <b>Ticha</b>    | Teckel                          | Feminino    | 6 anos       | Lesões cervicais e ocular direita  | Lactato limite Max.<br>Leucopénia<br>ALT, AST e FA↑  |
| <b>Tita</b>     | SRD                             | Feminino    | 7 anos       | Lesões cervicais e no MAD.<br>Edema e enfizema cervical.   | Claudicação intermitente do MP (fractura antiga).<br>Hipoglicémia<br>Trombocitopénia<br>FA ↑ |

FA – Fosfatase Alcalina | AST - Aspartato aminotransferase | ALT - Alanina aminotransferase

## 5.2 Anexo ii

Os resultados, referentes aos perfis hematológico e bioquímico, nos animais, pertencentes ao GE, em que tal foi efectuado, encontram-se nas tabelas seguintes.

**Tabela 26. Perfil hematológico – Hemograma**

| NÚMERO | HEMÁCIAS<br>(M/ $\mu$ l) | HEMATÓCRITO<br>(%) | HEMOGLOBINA<br>(g/dl) | VCM<br>(fl) | HCM<br>(pg) | CHCM<br>(g/dl) | RDW<br>(%) |
|--------|--------------------------|--------------------|-----------------------|-------------|-------------|----------------|------------|
| 12     | 5,03                     | 28,5               | 11,6                  | 76,5        | 23,1        | 30,2           | 8,1        |
| 13     | 6,8                      | 50,4               | 14,6                  | 71          | 21,5        | 29,1           | 6,1        |
| 15     | 4,77                     | 29,1               | 9,3                   | 61,1        | 19,5        | 31,9           | 10,4       |
| 16     | 6,61                     | 50,7               | 14,5                  | 76,8        | 21,9        | 28,6           | 6,4        |
| 17     | 6,29                     | 44,6               | 15                    | 70,9        | 23,9        | 33,7           | 7          |
| 18     | 7,76                     | 48,5               | 16,462                | 34,2        | 21,2        | 33,9           | 8,1        |
| 19     | 8,06                     | 59,6               | 17,5                  | 74          | 21,7        | 29,4           | 7,3        |
| 20     | 8,12                     | 49,9               | 17,5                  | 61,4        | 21,6        | 35,1           | 8,4        |
| 21     | 7,39                     | 47,7               | 16,5                  | 64,6        | 22,3        | 34,6           | 8,1        |
| 22     | 6,95                     | 52,4               | 16,4                  | 75,4        | 24,1        | 32             | 6,7        |

Valores de referência – Hemácias 5,5 - 8,5 M/ $\mu$ l | Hematócrito 37 - 55% | Hemoglobina 10,0 - 18,0 g/dl | VCM (volume Corpuscular Médio) 58 - 73 fl | HCM (Hemoglobina Corpuscular Média: 19,5 - 24,5 pg | CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) 28,0 - 40,0 g/dl | RDW ( "Red Cell Distribution Width") 12,0 - 18,0%

**Tabela 27. Perfil hematológico – Leucograma e contagem total de plaquetas**

| NÚMERO | LEUCÓCITOS<br>(K/ML) | GRANULÓCITOS<br>(K/ML) | LINFÓCITOS<br>(K/ML) | MONÓCITOS<br>(K/ML) | PLAQUETAS<br>(K/ $\mu$ L) |
|--------|----------------------|------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| 12     | 8,75                 | 6,8                    | 1,7                  | 0,2                 | 100                       |
| 13     | 7,41                 | 5,7                    | 1,6                  | 0,2                 | 128                       |
| 15     | 3,27                 | 1,7                    | 1,2                  | 0,4                 | 202                       |
| 16     | 9,19                 | 7,3                    | 1,6                  | 0,3                 | 156                       |
| 17     | 6,11                 | 3,3                    | 2                    | 0,8                 | 137                       |
| 18     | 5,63                 | 1,5                    | 0,6                  | 3,5                 | 206                       |
| 19     | 3,42                 | 2,4                    | 0,9                  | 0,1                 | 120                       |
| 20     | 6,43                 | 3,9                    | 0,9                  | 1,7                 | 120                       |
| 21     | 4,67                 | 1,9                    | 2                    | 0,7                 | 241                       |
| 22     | 6,08                 | 4,1                    | 1                    | 0,1                 | 64                        |

Valores de referência – Leucócitos 6,0 – 17,0 K/ $\mu$ l | Granulócitos 3,1 – 13,6 K/ $\mu$ l | Linfócitos 1,0 – 4,8 K/ $\mu$ l | Monócitos 0,2 – 2,0 K/ $\mu$ l | Plaquetas 120 – 600 K/ $\mu$ l



**Tabela 28. Perfil bioquímico – Hepático e Renal**

| <b>NÚMERO</b> | <b>ALT<br/>(U/L)</b> | <b>AST<br/>(U/L)</b> | <b>FA<br/>(U/L)</b> | <b>UREIA<br/>(mg/dl)</b> | <b>CREATININA<br/>(mg/dl)</b> |
|---------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <b>12</b>     | 53                   | -                    | 321                 | -                        | 0,9                           |
| <b>13</b>     | -                    | -                    | -                   | -                        | 0,6                           |
| <b>15</b>     | 63                   | -                    | 401                 | -                        | -                             |
| <b>16</b>     | -                    | -                    | -                   | -                        | 0,8                           |
| <b>17</b>     | 99                   | 97                   | 52                  | 71                       | 1                             |
| <b>18</b>     | 16                   | 30                   | 339                 | 54                       | 0,7                           |
| <b>19</b>     | 74                   | 132                  | 52                  | -                        | 0,6                           |
| <b>20</b>     | 47                   | 33                   | 191                 | -                        | 1                             |
| <b>21</b>     | 179                  | llegível             | 562                 | -                        | 0,6                           |
| <b>22</b>     | 27                   | 26                   | 95                  | 38                       | 0,8                           |

Valores de referência ALT (Alanina Aminotransferase) 13 - 92 U/L | AST (Aspartato Aminotransferase) 20 - 67 U/L | FA (Fosfatase Alcalina) 0 - 85 U/L | Ureia 6 - 24 mg/dl | Creatinina 0,4 – 1,2 mg/dl

### 5.3 Anexo iii

Protocolo experimental cedido por Tridelta Development Limited, Irlanda: “Phase <sup>TM</sup> Range”  
Canine C-Reactive Protein Assay

**PHASE RANGE**  
**Canine C-Reactive Protein Assay**  
**(Cat No: TP-803)**

Intended use

The activation of the body's immune system-mediated defence mechanisms is termed the acute phase response. Activation can occur due to infections, inflammation, tissue injury, neoplastic growth or immunological disorders. This assay is designed to detect the acute phase protein, C-Reactive protein, from the serum of dogs.

*Note: This product is for research purposes only.*

Introduction

C-Reactive Protein is one of the family of acute phase proteins found in the blood of both humans and animals. Under normal conditions it is found in low levels in the blood but can increase significantly in response to inflammatory conditions, infections and other disease states where tissue necrosis occurs, and therefore provides a highly sensitive indicator for these conditions.

Assay principle

The Tridelta Phase range canine CRP kit is a solid phase sandwich Immunoassay. Samples, including calibrators of known CRP content bind to coated microwells. After washing to remove any unbound material the HRP labeled Anti-canine-CRP antibody is added to each well. After again washing to remove any unbound material TMB substrate solution is added. The intensity of the colour produced is proportional to the concentration of CRP present in the original specimen.

Components Supplied

1. Coated microplate 1 x 96 well plate
2. C-Reactive protein calibrator 1 x 1.5ml (Ready to use)
3. Standard/sample diluent buffer 1 x 50ml (20x concentrate)
4. Anti-canine CRP Conjugate 1 x 11ml (Ready to use)
5. Wash concentrate 1 x 50ml (20x concentrate)
6. TMB Substrate 1 x 11ml (Ready to use)

7. Stop solution 1 x 11ml (Ready to use)

8. Information leaflet 1

#### Additional materials required

1. Serum collection equipment.
2. Microtiter plate reader capable of measurement at 450nm with reference at 630nm if available.
3. Accurate micropipettes and disposable tips to deliver 0-10µl, 20-200µl and 200-1000µl.
4. A repeat or multichannel pipette (50-200µl) for large assays.
5. Deionized or distilled H<sub>2</sub>O.
6. Plate washer (automated or manual).
7. Graph paper: Standard or semi-log.
8. Glass or plastic test tubes.
9. Absorbent paper towels
10. 96 well dust plate cover.
11. 37°C incubator.
12. Timer

#### Storage and Stability

The kit components are stable when stored at 2 -8°C until the expiry date indicated on the kit label.

#### Safety

- Never pipette by mouth.
- Wear disposable latex gloves and eye protection where appropriate.
- The stop solution and TMB substrate contain reagents that may irritate the skin or mucous membranes. Any reagent, which comes into contact with the skin, should be washed off with water immediately.

#### Sample Preparation

##### Samples

Specimens should be collected by venipuncture into serum collection tubes. Blood samples may be kept for up to 24 hours before separation of serum. However, it is best to remove serum from the clot as soon as possible after collection. In general, serum may be stored at 2-8°C for up to 24 hours or stored frozen at -20°C for longer periods without loss of CRP. It is important that all refrigerated samples are brought to room temperature and mixed to assure accurate determination of the CRP concentration. All samples should be diluted 1:500 in sample diluent buffer (1x) prior to assay by addition of 10µl of sample to 5.0 ml diluent buffer (1x). Do not use grossly haemolysed or lipaemic samples.

### Reagent Preparation

#### Diluent Buffer (1x)

Dilute 1 volume of diluent buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store both the diluent buffer concentrate and working diluent buffer (1x) in the refrigerator. Diluted diluent buffer is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

#### Wash Buffer (1x)

Dilute 1 volume of wash buffer concentrate (20x) with 19 volumes of distilled water. Store both the wash buffer concentrate and working wash buffer (1x) in the refrigerator. Diluted wash solution is stable for up to 2 weeks when stored at 4°C.

#### Calibration curve preparation

Label 6 tubes C1 to C6. To prepare the top calibrator, add 250µl of the calibrator supplied with the kit to tube C1 (see Table). Add 250µl 1x diluent buffer to each of the remaining tubes (C2-C6) as directed in table 1. The top calibrator is serially diluted 4 times (tubes C2 to C5) to provide the working calibrators as indicated in table 1 below. Tube C6 constitutes the assay blank and contains 1x diluent buffer only.

---

#### ***Preparation of working calibration curve***

| Tube No.            | CRP Concentration | Volume of calibrator | Volume of 1x diluents buffer | Serial dilution |
|---------------------|-------------------|----------------------|------------------------------|-----------------|
| C1 (Top calibrator) | 120 ng/ml         | 250µl                | -                            | -               |
| C2                  | 60 ng/ml          | 250µl                | 250µl                        | -               |
| C3                  | 30 ng/ml          | -                    | 250µl                        | 250µl of C2     |
| C4                  | 15 ng/ml          | -                    | 250µl                        | 250µl of C3     |
| C5                  | 7,5 ng/ml         | -                    | 250µl                        | 250µl of C4     |
| C6 (Blank)          | Blank             | -                    | 250µl                        | -               |

---

*The range provided represents a CRP concentration of 3.75 – 60µg/ml when sample dilution of 1:500 is taken into account.*

---

1. Determine the number of 8-well strips needed for the assay. Re-bag extra strips, seal bag and store desiccated in a refrigerator.
2. Add 100µl of the diluted sample or calibrator, in duplicate, to each well.
3. Cover the plate with a dust cover and incubate the plate for 15 minutes at 37°C.
4. After incubation aspirate or decant and wash the plate four times with diluted wash buffer. After the last wash tap the plate dry on absorbent paper.
5. Add 100µl of conjugate to each of the wells.
6. Cover the plate with a dust cover and incubate the plate for 15 minutes at 37°C.
7. After incubation aspirate or decant and wash the plate four times with diluted wash buffer. After the last wash tap the plate dry on absorbent paper.
8. Add 100µl of TMB Substrate.

9. Cover the plate with a dust cover and incubate the plate for 15 minutes at room temperature.
10. Add 100µl of stop solution and tap gently to mix.
11. Read the absorbance of each well at 450nm using 630nm as a reference.

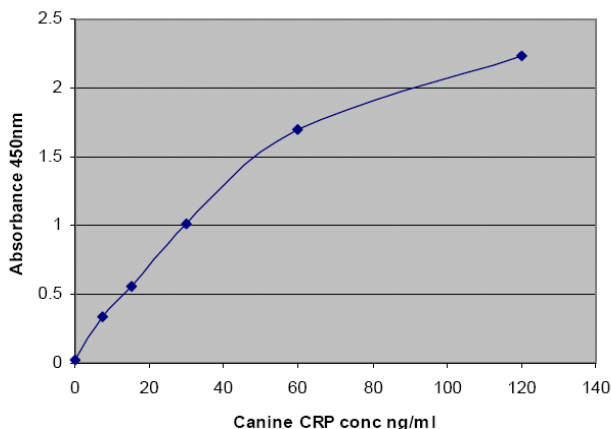
#### Interpretation of Test Results

1. Calculate the mean absorbance for each sample, control or calibrator.
2. Plot the absorbance of the calibrators against the calibrator concentration on standard or semi-logarithmic graph paper. (If necessary, the background absorbance for the 0ng/ml may be subtracted from each of the data points, including the calibrators, unknowns and controls prior to plotting). Draw the best smooth curve through these points to construct the calibration curve. Determine the concentrations of the test samples and controls from the calibration curve by multiplying the interpolated value by the appropriate dilution factor. Samples that have a signal greater than the top calibrator, or fall on the non-linear part of the curve, should be further diluted in diluent buffer and re-analysed.

#### Typical Data

An example of a typical calibration curve is represented below. This should not be used in the determination of canine CRP

#### Canine CRP Calibration curve



#### Assay Reproducibility

Two samples containing medium and low levels of Canine CRP were run in independent assays. To determine inter assay reproducibility the mean and the coefficient of variation (%CV) were calculated.

### Inter assay variation

| Control                   | Level1 | Level2 |
|---------------------------|--------|--------|
| <i>N</i>                  | 32     | 32     |
| <i>Mean (µg/ml)</i>       | 14,9   | 34,6   |
| <i>Standard deviation</i> | 1,2    | 2,7    |
| <i>CV(%)</i>              | 8,2    | 7,8    |

Two samples containing medium and low levels of canine CRP were tested in a single assay. To establish intra assay reproducibility the mean and the coefficient of variation (%CV) were calculated.

### Intra assay Variation

| Control                   | Level1 | Level2 |
|---------------------------|--------|--------|
| <i>N</i>                  | 16     | 16     |
| <i>Mean (µg/ml)</i>       | 15,4   | 35,8   |
| <i>Standard deviation</i> | 1,1    | 2,3    |
| <i>CV(%)</i>              | 6,9    | 6,5    |

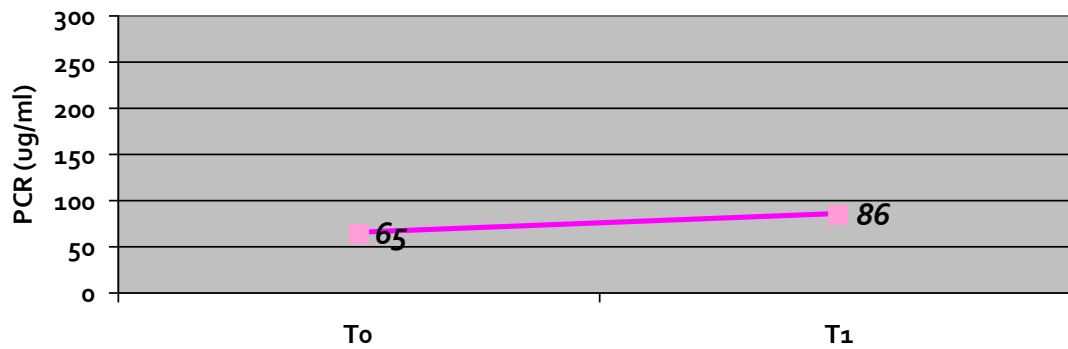
### Limitations of Test

The use of this test for the analysis of plasma samples has not been fully investigated. Haemolysed or lipaemic samples should not be used in the test

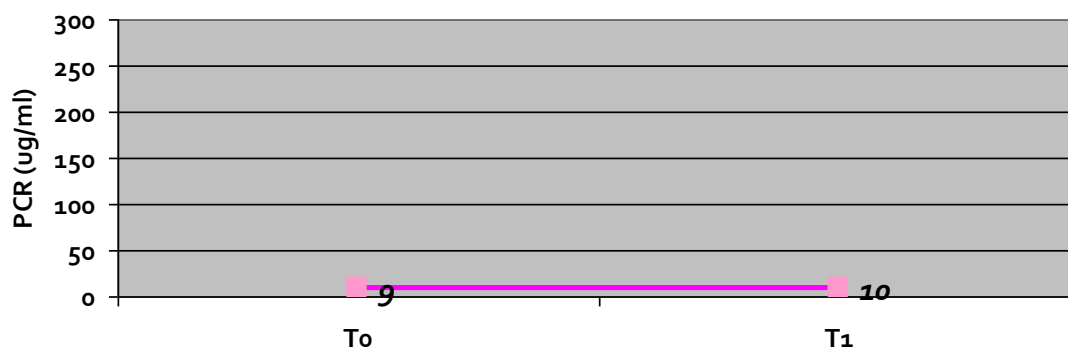
#### 5.4 Anexo iv

Os valores referentes às concentrações da PCR em cada paciente, nos diferentes tempos nos quais foi mensurada, são apresentadas de seguida.

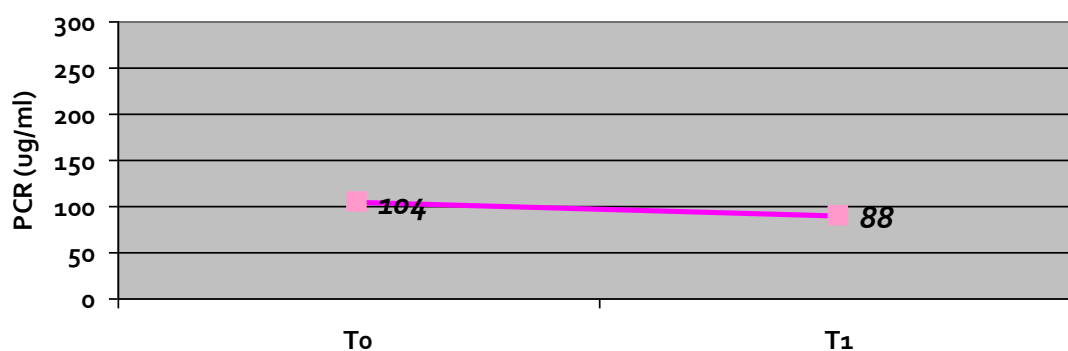
Paciente 11



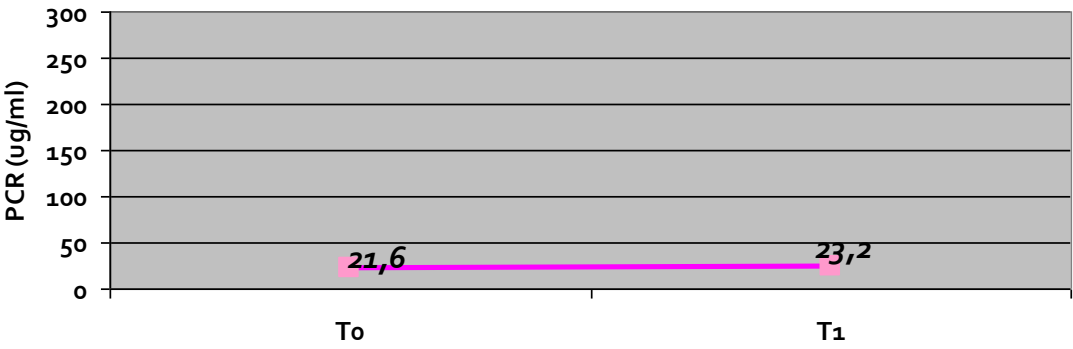
Paciente 12



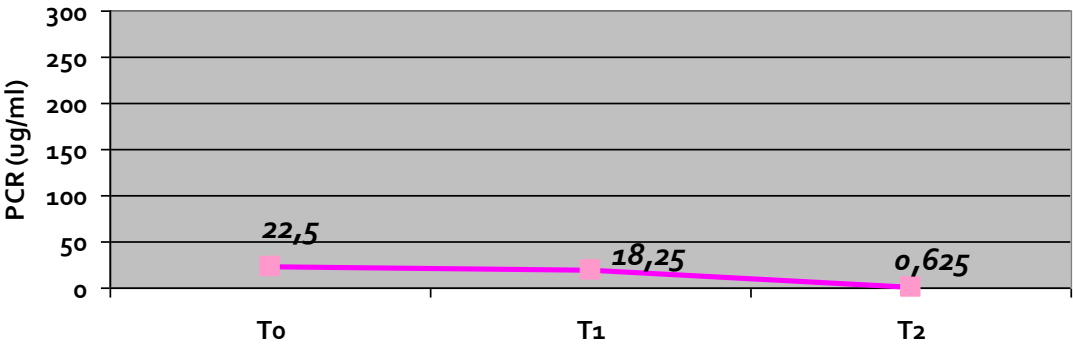
Paciente 13



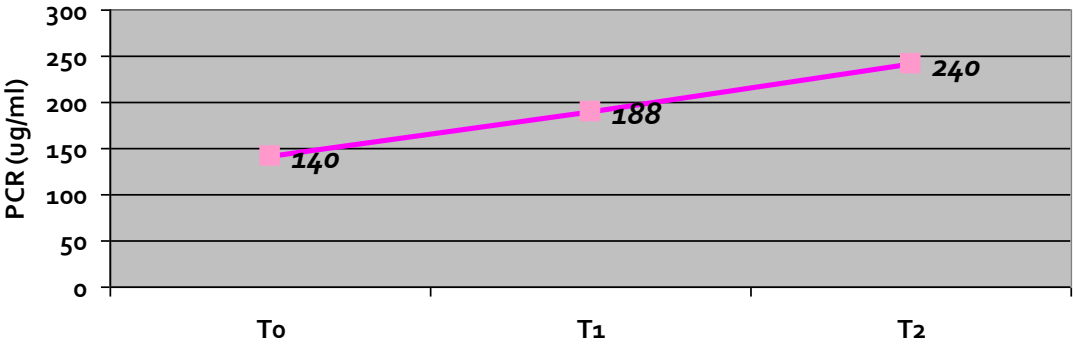
Paciente 14



Paciente 15

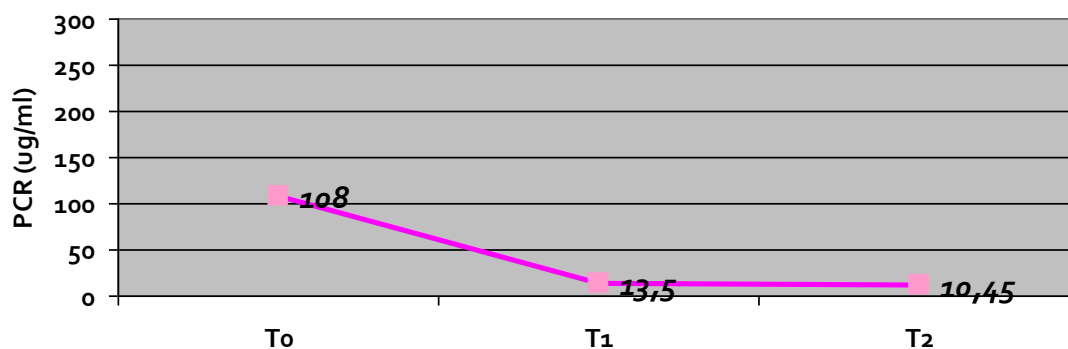


Paciente 16

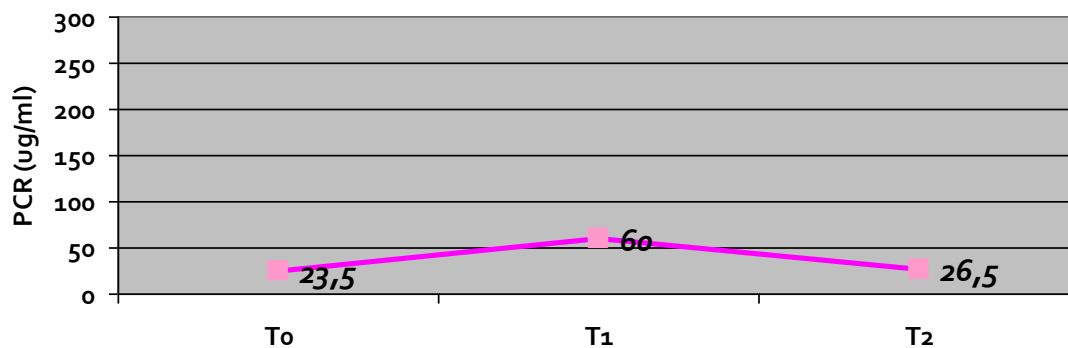




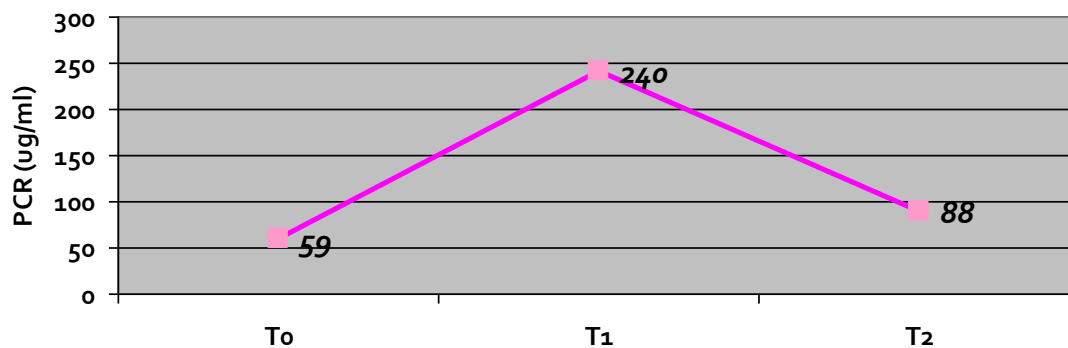
Paciente 17



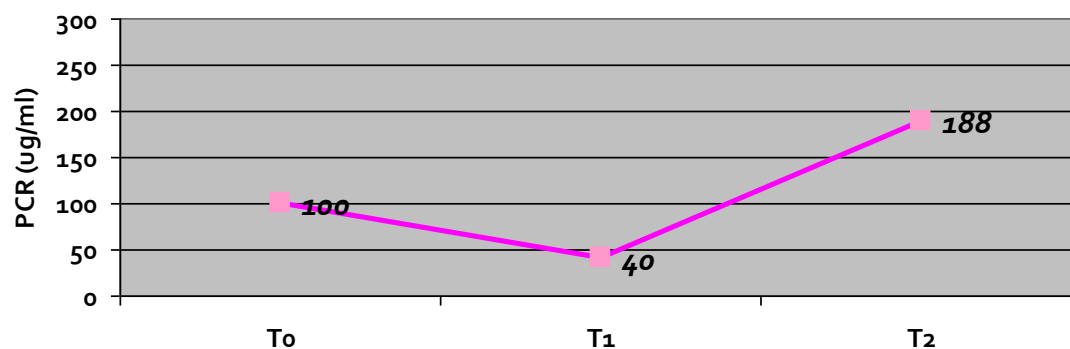
Paciente 18



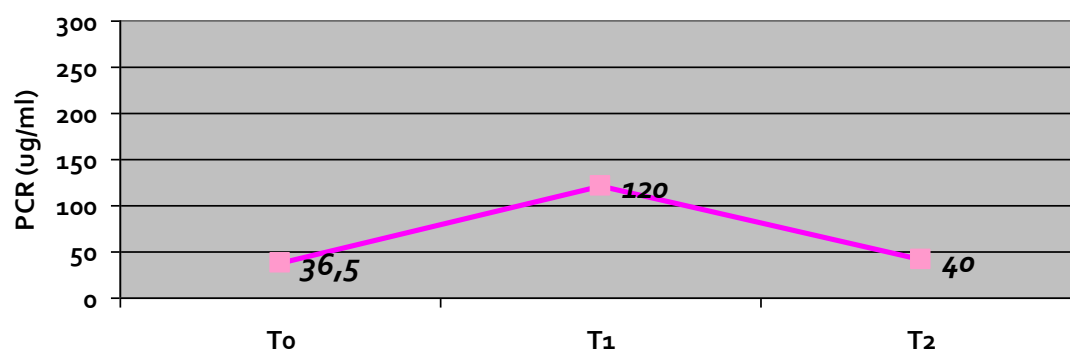
Paciente 19



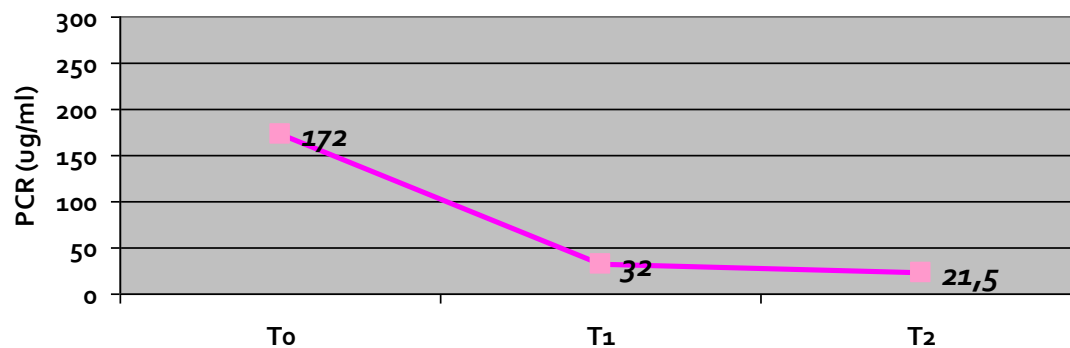
Paciente 20



Paciente 21

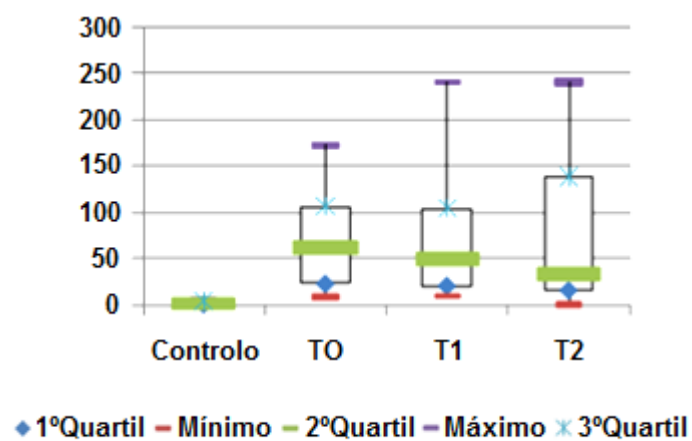


Paciente 22



## 5.5 Anexo v

**Gráfico 3. Gráfico de extremos e quartis referente ao GC e ao GE (T0, T1 e T2)**



## 5.6 Anexo vi

Este trabalho foi submetido a apresentação sobre a forma de comunicação oral no VI Congresso Hospital Veterinário Montenegro realizado nos dias 23 e 24 de Janeiro de 2010.

### “QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C-REACTIVA EM CÃES TRAUMATIZADOS E SUA IMPORTÂNCIA NA UNIDADE DE CUIDADOS INTENSIVOS”.

M. R. Pina<sup>1</sup>, C. Pomba<sup>1</sup>, N. Paixão<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UTL – Universidade Técnica de Lisboa; Faculdade de Medicina Veterinária - Lisboa, Portugal |

<sup>2</sup> Hospital Veterinário Central – Charneca da Caparica - Almada, Portugal

Em Medicina Humana, as proteínas de fase aguda são utilizadas para verificar/avaliar a presença de inflamação/infecção, evolução de uma patologia, ou resposta a tratamento. A existência da Proteína C Reactiva canina (PCR-c) foi confirmada em 1984.

Este estudo teve como objectivo primordial a quantificação das concentrações séricas da PCR-c, em pacientes com história de trauma ( $n=12$ ), admitidos na unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Veterinário Central, bem como a sua interpretação, tendo em conta as diferenças entre os níveis médios observados nestes pacientes e em pacientes saudáveis (GC) ( $n=10$ ). Procedeu-se à recolha de amostras de sangue de cada paciente incluído no grupo de estudo (GE), imediatamente após entrada no já referido Hospital ou imediatamente antes da cirurgia (T0), no decorrer da hospitalização (T1), e nos pacientes em que tal foi possível ( $n=8$ ), durante o período de recuperação (T2). Nos animais pertencentes ao GC procedeu-se à recolha de uma única amostra. As concentrações da PCR-c foram quantificadas pelo método ELISA – técnica “sandwich” (Phase<sup>TM</sup> Range” Canine C-reactive Protein Assay – Tridelta Development Limited”). Pretendeu-se simultaneamente, com este estudo, relacionar os níveis séricos da PCR-c com a gravidade da lesão, reflectida na morbilidade/mortalidade do paciente em questão, tendo-se para tal estudado a correlação entre as concentrações máximas ( $\mu\text{g/ml}$ ) da PCR-c em 10 dos 12 pacientes do GE e o tempo decorrido até à sua recuperação (dias).

Conclui-se que as concentrações da PCR-c estavam acima dos valores normais ( $<6 \mu\text{g/ml}$ ) em todos os pacientes com história de trauma. As concentrações em T0 ( $71,758 \pm 52,672 \mu\text{g/ml}$ ), mostraram-se significativamente elevadas quando comparadas às concentrações da PCR-c no GC ( $2,375 \pm 1,953 \mu\text{g/ml}$ ). Não existiu um decréscimo nas concentrações médias da PCR-c no decurso do tratamento médico/cirúrgico. Existe uma fraca correlação ( $r=0,074$ ) entre os níveis máximos da PCR-c e o número de dias de recuperação.

Palavras-chave: Proteína C Reactiva, cão, trauma, morbilidade, mortalidade.

“QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C-REACTIVA EM CÃES TRAUMÁTICOS E SUA IMPORTÂNCIA NA UNIDADE DE CUIDADOS INTENSIVOS”.

Maria Raquel Laires Fraga Morais de Pina

Estudante Estagiária de Medicina Veterinária na Universidade Técnica de Lisboa. Efectuou o seu estágio curricular no Hospital Veterinário Central e no *Hospital Clinic Veterinari* da Universidade Autónoma de Barcelona.

*Rua Luíza Neto Jorge, nº20, 2ºDto; 2795 Carnaxide, Lisboa – Portugal | marapina@hotmail.com*

### **DECLARAÇÃO**

Eu, Maria Raquel Laires Fraga Morais de Pina, certifico que este trabalho nunca foi aceite para publicação e que todos os autores estão de acordo que esta comunicação seja apresentada no VI Congresso Hospital Veterinário Montenegro a realizar em 23 e 24 de Janeiro de 2010.

Charneca da Caparica, 18 de Novembro de 2009

Assinatura

---

(Maria Raquel Laires Fraga Morais de Pina)

